

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'École Normale Supérieure de Lyon - Université de Lyon

Discipline : Sciences de la vie

Unité de Virologie Humaine – U758
Ecole Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 30 novembre 2012 par

Monsieur Quentin BAZOT

Etude des fonctions des protéines virales de la famille EBNA3 dans l'immortalisation des lymphocytes B par le virus d'Epstein-Barr : rôle fonctionnel de l'interaction entre EBNA-3A et la protéine cellulaire Miz-1.

Directrice de thèse : Madame Evelyne MANET

Après l'avis de : Monsieur Jean FEUILLARD
Monsieur Vincent MARECHAL

Devant la commission d'examen formée de :

Monsieur Jean FEUILLARD
Monsieur Pierre JALINOT
Madame Evelyne MANET
Monsieur Vincent MARECHAL
Monsieur Bernard MARIAMÉ

Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Rapporteur
Examineur

A Mathieu...

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier celle sans qui rien n'aurait été possible, ma directrice de thèse, le Dr Evelyne Manet. Je la remercie du fond du cœur pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire alors que je n'étais qu'un petit étudiant en Master 2 et de m'avoir fait confiance pour mener ce travail de recherche au cours de ces années. Un énorme MERCI pour sa sympathie, sa disponibilité, ses encouragements, ses idées et conseils, ainsi que pour son aide précieuse de tous les jours. Je la remercie également de m'avoir donné l'opportunité d'assister à plusieurs congrès internationaux.

Je tiens à remercier le Pr Jean Feuillard et le Pr Vincent Marechal qui ont tous les deux accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissant.

Je souhaite aussi adresser mes plus vifs remerciements au Dr Pierre Jalinot et au Dr Bernard Mariamé pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon comité de suivi de thèse ainsi que pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite aussi remercier la fondation ARC ainsi que tous ses donateurs qui, en finançant ma quatrième année de thèse, m'ont grandement aidé à réaliser mes travaux de thèse.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de tous les membres de l'EBV Team, passés et présents, qui ont tous contribué à faire de ces années un excellent souvenir.

Je tiens à remercier le Dr Henri Gruffat pour la gentillesse et la patience qu'il a manifestées à mon égard durant ces années de thèse, pour tous les conseils qu'il m'a donnés ainsi que pour sa disponibilité.

Mes remerciements vont également au Dr Pascal Leblanc et au Dr Sandrine Alais pour toutes les discussions que nous avons pu avoir ainsi que vos encouragements. Je tiens aussi, Sandrine, à te remercier tout particulièrement pour toutes les fois où tu m'a conduit jusqu'à l'aéroport pour rejoindre ma belle à London city ainsi que pour la magnifique Molly en chocolat que j'ai un jour pu retrouver sur mon bureau.

Je tiens aussi à remercier le Dr Alain Sergeant pour tous les conseils et les remarques pertinentes qu'il m'a fourni lors de ma thèse.

J'adresse une pensée particulière au Dr Franceline Juillard qui a été ma « colloque » de bureau pendant 4 ans et qui a donc dû alterner entre collègue, psychologue, et amie. Merci pour tous tes conseils, pour ta disponibilité sans faille, pour tous tes encouragements et ton soutien au quotidien lorsque le dieu de l'IP n'était pas à mes côtés. Merci tout simplement de m'avoir supporté !! Je te souhaite bonne route aux USA (Boston and Kieff forever !).

Un grand merci à mon petit Fabriçounet (Fabrice Mure, ou Francis Framboise pour les intimes) pour toute l'aide qu'il m'a apportée durant ma thèse. Je sais que tu seras le premier à minimiser tout l'apport que tu m'as fourni mais je tiens réellement à te remercier pour tout car tu as toujours été disponible et prêt à rendre service. Bonne continuation à toi futur Docteur Mure !! Merci à l'aventurier Dimitri Mompelat pour toutes les discussions que l'on a pu avoir et pour toutes les tablettes de chocolat que tu nous as apportées. Je remercie l'Artiste (Valentin Aubry, fils de Martine oui oui) d'être tout simplement l'artiste et de participer involontairement à la bonne ambiance et aux franches rigolades du Labo. Je te félicite encore une nouvelle fois pour la réussite de ton concours et te souhaite bonne chance pour ta thèse

dans cette merveilleuse équipe. Je tiens également à remercier Marine Ponchon et le Coach (Hugo Poplimont) pour avoir accepté d'être mes premiers stagiaires. Je remercie tout particulièrement le Coach pour sa bonne humeur quotidienne, son optimisme, ses entraînements de musculation hors du commun, ainsi que pour avoir grandement participé à la bonne ambiance du laboratoire lors de mes longues journées d'écritures. Ne t'inquiète pas, un jour toi aussi tu réussiras un « Coach Spécial » !! Bonne chance pour ton Stage à Boston. Je tiens également à remercier François Briat pour toute la pêche qu'il apportait chaque matin, sa gentillesse et pour nous avoir fait partager sa connaissance sans limite sur les bières et alcools en tout genre. Je te souhaite une bonne continuation et que l'esprit CUIR ET MOUSTACHE soit avec toi.

Enfin, je tiens à remercier 3 personnes qui, bien plus que des collègues de travail, sont devenus de réels amis :

* Merci à toi Jess (Jessica Cottarel) pour tous les bons moments que nous avons passé au laboratoire (notamment de belles parties de frisbee), pour ton aide, ta bonne humeur communicative, et tes chansons de Lady GAGA. Merci de m'avoir toujours écouté et soutenu dans les mauvais moments que connaît un thésard. Je te souhaite bon courage pour ta soutenance qui aura très vite lieu.

* Un grand et sincère Merci à Sandrine la Sardine (Sandrine Duron) qui a été ma seconde colloque de bureau et qui a dû endurer et supporter mes musiques du matin au soir : de Brassens aux Spice Girls en passant par Patrick Sébastien ça n'a pas du être facile tous les jours. Je te remercie pour tous les délires que nous avons pu avoir ainsi que pour toute l'aide que tu m'as apportée durant toutes ces années et pour toutes les fois où tu m'as écouté et soutenu, du fond du cœur merci. Bon courage pour la suite, Paris t'attend avec impatience.

* Et enfin un ENORME MERCI à ma grande TATA à moi, à mon frère de Latence, à mon faux frère, à pépito : Thibaut Deschamps. Merci pour toutes les discussions scientifiques que nous avons pu avoir, pour tes nombreuses suggestions ainsi que ta grande contribution à mon travail de thèse. Tu as toujours misé sur Miz (sans aucun jeu de mot) et tu as toujours été le premier à vouloir me rendre service et à mettre toute ton énergie pour que ce projet soit mené au mieux et je t'en remercie mille fois. Merci pour toutes ces séances de rires, de danses (Mitraillette à droite...mitraillette à gauche !!), et de sport (un jour peut être tu me gagneras au ping-pong). Merci pour toutes ces fois où nous avons refait le monde autour d'un café sur les marches de l'entrée du labo, d'un rosé sur la pelouse de l'ENS, autour d'un petit Starbuck dans les vertes plaines de Central Park, ou encore autour d'une bière et d'une table de billard dans un petit pub New yorkais (New York City Super Gay !!). Bon courage pour la suite Bro !!

Durant ces années j'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'unité de Virologie Humaine. Je pense particulièrement à Sandrine Forel, toujours souriante et disponible, ainsi qu'à Rhania Lakehal et tout le personnel de la laverie.

Mes remerciements vont également au Dr Vincent Lotteau qui m'a permis d'œuvrer quelques mois au sein de son laboratoire au début de ma thèse. Je tiens également à adresser un grand merci à toute l'équipe I-MAP, et plus particulièrement à Lionel (le Roi de la levure) pour sa patience, son aide, sans oublier sa bonne humeur quotidienne.

Je tiens à remercier tous mes amis de longue date qui m'ont tous posé au moins une fois la question fatale « Alors, elle avance cette thèse ? ». Je pense particulièrement à mes deux Ptits poulets réunionnais Jacques et Léa ainsi qu'à Youssef et Aurélie (merci à vous quatre

pour toutes ces soirées Triple/Ninka/Maggy Smith). Une énorme pensée à Quentin Numéro 1 (les quelques mois en colloque ont été magique !!) et à Marie, je vous souhaite un bon départ et vous dis à bientôt en Ukraine ! Un grand Merci au futur « Doktor Quentin Lagadec » avec qui nous avons souvent refait le monde autour d'une petite bière ou d'un café à parler de nos thèses respectives. Je pense aussi à la bande du Surfin'Chicken du Sérignan plage, loic (merci pour toutes nos soirées Mario Kart), la Frite (courage pour ta thèse ma fritoune) et Geo (promis je pense à toi pour la commercialisation d'une nouvelle molécule de ce que tu sais). Je pense aussi à tous mes amis de Millery beach; Nico, Bastou, Steph, Clélia et Ludo. Merci à tous de m'avoir toujours aidé, encouragé, et m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin. Enfin, je remercie tous ceux et celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer.

Je souhaiterais remercier Sir Anthony Epstein, le Dr Yvonne Barr ainsi que le Dr Bert Achong pour la découverte de cet extraordinaire virus qui a bercé mes douces et belles années de thèse, le virus d'Epstein-Barr. Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner les contributeurs musicaux qui m'ont accompagné lors de ma thèse ainsi que lors de la rédaction de mon manuscrit, merci à Monsieur Gorges Brassens, à Keane, à l'excellent Richard Gotainer, au grandiose Sébastien Tellier, aux Bloody Beetroots, aux playlists des magasins Abercrombie & Fitch et Hollister, ainsi qu'aux différentes radios spéciales années 90. Je tiens aussi à remercier Nescafé qui a été mon sponsor officiel de café pendant ces quatre années de thèse. Enfin, je tiens à remercier Molly (le petit mouton) qui a été ma mascotte et à qui je voue un culte sans limite.

Mes dernières pensées iront vers ma famille, et surtout mes parents, qui m'ont toujours soutenu et qui m'ont permis de poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui. Merci pour tout, je n'ai pas assez de mots pour vous exprimer toute ma reconnaissance car je n'aurais jamais pu arriver là sans vous.

Enfin, je ne pourrais oublier de remercier ma moitié, la jeune, belle, charmante, pétillante et intelligente Lucile. Je pense qu'il me faudrait une thèse entière pour te dire à quel point je t'aime et à quel point je te remercie pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Merci de m'avoir supporté et d'avoir toujours été présente, dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci tout simplement d'être toi et d'égailler tous les jours un peu plus ma vie par tes éclats de rire, ta joie de vivre et ton optimisme.

Résumé :

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un γ -Herpesvirus associé à de nombreux cancers chez l'homme. *In vitro*, l'infection de lymphocytes B primaires par EBV conduit à leur immortalisation (genèse de lignées lymphoblastoïdes (LCL)). Dans ces cellules, seules 9 protéines virales (protéines dites de latence) sont exprimées et coopèrent pour stimuler la prolifération des cellules. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les 3 protéines de latence de la famille EBNA3 (-3A, -3B et -3C) participent à l'induction et au maintien de la prolifération cellulaire induite par EBV, nous avons réalisé un crible deux-hybrides dans la levure en utilisant EBNA-3A, -3B ou -3C comme appâts. Ce crible nous a permis d'identifier de nombreux nouveaux partenaires particulièrement pertinents au vu de ce que l'on connaît des rôles respectifs des protéines EBNA3. Parmi les nouveaux partenaires de la protéine EBNA-3A se trouve le facteur de transcription Miz-1 qui est connu pour jouer un rôle clef dans l'arrêt du cycle cellulaire en transactivant l'expression de gènes tels *CDKN1A*, *CDKN1C* et *CDKN2B*. Nous avons validé cette interaction par GST-pull down ainsi que par co-immunoprécipitation en cellules humaines. Nous avons ensuite étudié l'effet de la protéine virale EBNA-3A sur l'activation de la transcription induite par Miz-1. Pour cela, nous avons comparé le niveau des transcrits de certains gènes cibles de Miz-1 dans des LCL exprimant ou non EBNA-3A et avons trouvé que certains gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire sont différemment exprimés en présence d'EBNA-3A. Enfin, nous avons pu montrer que la protéine virale EBNA-3A est capable de réprimer l'activation de la transcription de Miz-1 en inhibant le recrutement de l'une de ses protéines co-activatrices, la protéine NPM. Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les protéines EBNA3 et plus largement EBV, dérégulent le cycle cellulaire.

Mots clés : Virus d'Epstein-Barr, cycle cellulaire, protéines EBNA3, EBNA-3A, Miz-1.

Abstract :

Epstein-Barr Virus (EBV) is a human Herpesvirus that infects over 90% of the world population and is associated with several malignancies. EBV has the unique capacity to activate and to induce growth transformation of resting primary human B-lymphocytes, upon their *in vitro* infection, leading to the establishment of lymphoblastoid cell lines (LCLs). In these cells (called Lymphoblastoid cell lines (LCLs)), nine latent proteins are expressed driving the activation and proliferation of the infected B cells. In order to understand the molecular mechanism by which the EBNA3 latent proteins play a role in growth transformation, we used a large scale two-hybrid yeast screen. Thanks to that screen we identified several cellular partners very interesting in relation to what we know about the EBNA3s functions. One of the proteins identified in this screen is the transcription factor Miz-1, which has a cell growth arrest activity via inhibition of cell-cycle progression and has been shown to activate transcription of target genes including *CDKN1A*, *CDKN1C* and *CDKN2B*. We confirmed the interaction between EBNA-3A and Miz-1 by GST-pull down assay as well as by co-immunoprecipitation in HeLa cells. We next investigated the effect of EBNA-3A on Miz-1-dependent regulation by comparing the transcript levels of selected Miz-1 target genes between EBNA-3A positive and negative LCLs by RT-qPCR. Interestingly, several Miz-1 target genes, among which *CDKN2B*, were found to be differentially regulated in the presence of EBNA-3A. We found that EBNA-3A inhibits Miz-1 dependant activation by inhibiting the recruitment of the co-activator NPM. Those results bring new insights to the mechanisms by which the EBNA3s, and more largely EBV, regulate the cell cycle.

Keyword : Epstein-Barr Virus (EBV), cell cycle, EBNA3 proteins, EBNA-3A, Miz-1.

Abréviations

A

aa : Acide Aminé
AD : Activation Domain
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
APC/C : Anaphase Promoting Complex/Cyclosome
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
3AT : 3-Amino-1,2,4-Triazole
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related

B

BL : Lymphome de Burkitt
BA : Acide Butyrique
BART : BamHI A Rightward Transcripts
BCR : Récepteur des cellules B
BTD : Beta Trefoil Domain
BTM : Basal Transcription Machinery
bZIP : basic zipper

C

CDK : Kinase cycline-dépendante
CDKi : Inhibiteur des CDK
ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : CytoMégaloVirus
Co-IP : Co-ImmunoPrécipitation
CT : C-Terminal
CTD : Domaine C-Terminal
CTAR : C-Terminal Activating Region

D

DBD : DNA Binding Domain
DDR : DNA Damage Response
DLBCL : Diffuse Large B Cell Lymphoma
DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium
DNA : DeoxyriboNucleic Acid
DS : Dyad Symetry

E :

EBER : Epstein-Barr Encoded RNA
EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigen
EBV : Epstein-Barr Virus
ED-L1 : EcoRI D fragment-located LMP1 promoter

F

FR : Family of Repeats
FRET : Förster Resonance Energy Transfer

G

GEF : Facteur échangeur de guanine
GFP : Green Fluorescent Protein
GST : Glutathion S-Transferase
GTP : Guanosine Tri-Phosphate

H

HAT : Histone acétyltransférase
HDAC : Histone déacétylase
HHV : Human HerpesVirus
HSV : Herpes Simplex Virus

I

IFN- α : Interféron α
IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1
IL : Interleukine
INR : Element Initiateur
IR : Internal Repeat
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activator Motif

K

KDa : Kilo Dalton
kpb : kilo paire de bases
KSHV : Kaposi Sarcoma associated HerpesVirus

L

LCL : Lignées Lymphoblastoïdes
LMP : Latent Membrane Protein
LT : Lymphocytes T
LyLMP1 : Lytique LMP1

M

MEC : Matrice extra-cellulaire
MCRS1 : Microspherule protein 1

miARN : micro ARN

Miz-1 : Myc-interacting zinc finger protein 1

MMP : métalloprotéinases matricielles

MNI : Mononucléose Infectieuse

N

NES : Nuclear Export Signal

NF-Y : Nuclear transcription factor Y

NK : Natural Killer

NLS : Nuclear Localization Signal

NPC : Carcinome du Nasopharynx

NTD : Domaine N-Terminal

O

ORF : Open Reading Frame

ori-Lyt : origine de réplication Lytique

oriP : origine de réplication Plasmidique

P

pb : paire de bases

pRb : protéine du Rétinoblastome

PCR : Polymerase Chain Reaction

POZ : Poxvirus and zinc finger

PPP5C : Protéine phosphatase 5, catalytic subunit

PRC : Complexe répresseur polycomb

PTK : Protéine Tyrosine Kinase

R

RCC1 : Régulateur de la Condensation Chromosomique 1

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR

RT-qPCR : Real Time quantitative PCR

S

SAF : Spindle Assembly Factors

shARN : small hairpin ARN

SHD : Stonin Homology Domain

siARN : small interference ARN

SR : Serine / Arginine

T

TBP : TATA-box Binding Protein

TCDD : 2,3,7,8-TetraChloroDibenzo-p-Dioxin

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TNF : Facteur de Nécrose Tumoral

TPA : 12-O-Tétradécanolyl-Phorbol 13-Acetate

TR : Terminal Repeats

TRAF : Facteur associés au récepteur du TNF

TR-LMP1 : Terminal Repeat-located LMP1

U

UAS : Upstream Activation Sequence

US : Unique Small

UL : Unique Long

V

VDR : Vitamin D Receptor

VZV : Varicella-Zoster Virus

X

XRE : Xenobiotic Response Element

Y

Y2H : Yeast Two-Hybrid

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE SUR LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR.....	17
I. GENERALITES SUR LE VIRUS D'EPSTEIN BARR	19
I. 1. DECOUVERTE DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR	19
I. 2. CLASSIFICATION D'EBV	20
II. CARACTERISTIQUES DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR.....	23
II. 1. STRUCTURE DU VIRION	23
II. 2. LE GENOME VIRAL	23
II. 3. POLYMORPHISME GENETIQUE D'EBV	25
II. 4. LES VOIES DE TRANSMISSION D'EBV	26
III. INFECTION PAR LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR	26
III. 1. LA PHASE DE LATENCE	26
<i>III. 1. 1. La Latence de type III et l'immortalisation des cellules B in vitro.....</i>	<i>27</i>
III. 1. 1. 1. Les protéines nucléaires	30
III. 1. 1. 1. 1. La transcription des EBNA.....	30
III. 1. 1. 1. 2. La protéine EBNA1	32
III. 1. 1. 1. 3. La protéine EBNA2.....	33
III. 1. 1. 1. 4. La protéine EBNA-LP.....	38
III. 1. 1. 1. 5. Les protéines EBNA3.....	39
III. 1. 1. 2. Les protéines membranaires	40
III. 1. 1. 2. 1. La transcription des LMP.....	40
III. 1. 1. 2. 2. La protéine LMP1.....	41
III. 1. 1. 2. 3. Les protéines LMP2 : LMP2A et LMP2B.....	44
III. 1. 1. 3. Les ARN viraux non codants.....	47
III. 1. 1. 3. 1. EBER 1 et EBER 2.....	47
III. 1. 1. 3. 2. Les ARN BART et les microARN viraux	49
<i>III. 1. 2. Les différentes formes de latence d'EBV.....</i>	<i>50</i>
III. 2. REACTIVATION DU VIRUS ET CYCLE PRODUCTIF	52
<i>III. 2. 1. La réactivation</i>	<i>52</i>
<i>III. 2. 2. Le cycle productif.....</i>	<i>53</i>
III. 2. 2. 1. Les gènes immédiats précoces	53
III. 2. 2. 2. Les gènes précoces	55
III. 2. 2. 3. Les gènes tardifs	56
IV. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR.....	57
IV. 1. LES DIFFERENTES ETAPES DE L'INFECTION.....	57
<i>IV. 1. 1. Entrée du virus dans ses cellules cibles</i>	<i>57</i>
IV. 1. 1. 1. Entrée du Virus dans les Lymphocytes B.....	57
IV. 1. 1. 2. Entrée du Virus dans les cellules épithéliales.....	58
IV. 1. 1. 3. La glycoprotéine gp42, protéine clé du tropisme d'EBV.....	60
IV. 1. 1. 4. Entrée du virus dans les autres types cellulaires	60
<i>IV. 1. 2. Transport du génome viral jusqu'au noyau.....</i>	<i>62</i>
<i>IV. 1. 3. Assemblage et sortie du virion.....</i>	<i>62</i>
IV. 2. CHRONOLOGIE DE L'INFECTION PAR EBV <i>IN VITRO</i>	63
IV. 3. CHRONOLOGIE DE L'INFECTION PAR EBV <i>IN VIVO</i>	65
PARTIE 1 : FONCTIONS DES PROTEINES VIRALES DE LA FAMILLE EBNA3 DANS	
L'IMMORTALISATION DES LYMPHOCYTES B PAR LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR	75
CHAPITRE I : INTRODUCTION SUR LES PROTEINES EBNA3	77
I. LES EBNA3, TROIS PROTEINES APPARENTÉES	79
I. 1. UNE ORGANISATION GENOMIQUE IDENTIQUE.....	79
I. 2. DES PROTEINES STRUCTURALEMENT SIMILAIRES.....	80

I. 3. POLYMORPHISME DES PROTEINES EBNA3	82
I. 4. DES PROTEINES APPARENTÉES AUX FONCTIONS DIFFÉRENTES DANS L'IMMORTALISATION	82
II. REGULATION DE LA TRANSCRIPTION PAR LES PROTEINES EBNA3	84
II. 1. LES PROTEINES EBNA3 ET LA TRANSCRIPTION AUX PROMOTEURS VIRAUX	84
II. 1. 1. <i>Les EBNA3 sont des régulateurs transcriptionnels</i>	84
II. 1. 2. <i>Les EBNA3 et la protéine RBP-Jκ</i>	86
II. 1. 3. <i>Les promoteurs viraux cibles des EBNA3</i>	91
II. 1. 4. <i>Les mécanismes d'action des EBNA3</i>	93
II. 2. LES PROTEINES EBNA3 ET LA TRANSCRIPTION DE PROMOTEURS CELLULAIRES	96
II. 2. 1. <i>Etudes transcriptomiques à grand échelle</i>	97
II. 2. 2. <i>Répression épigénétique et coopération entre les protéines EBNA-3A et EBNA-3C</i>	99
II. 2. 2. 1. Répression du gène CDKN2A	100
II. 2. 2. 2. Répression du gène bim	101
II. 2. 3. <i>Mécanismes de Régulation de gènes cellulaires par EBNA-3A</i>	101
II. 2. 3. 1. Régulation du récepteur d'hydrocarbures aromatiques AhR	101
II. 2. 3. 2. Régulation du récepteur à la vitamine D	103
II. 2. 4. <i>Régulation par EBNA-3C des processus métastatiques en coopération avec Nm-23-H1</i>	103
II. 2. 4. 1. Régulation de la migration cellulaire par l'intégrine α5	104
II. 2. 4. 2. Régulation de la métalloprotéinase matricielle 9	104
II. 2. 4. 3. Régulation de la cyclo-oxygénase 2	106
III. LES PROTEINES EBNA3 ET LE CYCLE CELLULAIRE	106
III. 1. LE CYCLE CELLULAIRE	106
III. 2. FONCTIONS DES EBNA3 DANS LE CYCLE CELLULAIRE	108
III. 2. 1. <i>Les protéines EBNA3 et les différentes phases du cycle</i>	109
III. 2. 1. 1. La transition G ₁ /S	109
III. 2. 1. 2. La phase S	113
III. 2. 1. 3. La phase G ₂ /M	114
III. 2. 1. 4. Le point de surveillance du fuseau mitotique	116
III. 2. 2. <i>Interaction des EBNA3 avec des protéines clés du cycle cellulaire</i>	117
III. 2. 2. 1. La protéine p53	117
III. 2. 2. 2. L'oncoprotéine c-Myc	120
IV. LES PROTEINES EBNA3 IN VIVO	121
V. CONCLUSION	123
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	125
I. RECHERCHE DE NOUVEAUX PARTENAIRES CELLULAIRES POUR LES PROTEINES EBNA3	127
I. 1. LE CRIBLE DEUX-HYBRIDES	127
I. 1. 1. <i>Principe du deux-hybrides en levure</i>	127
I. 1. 2. <i>Construction des plasmides appâts</i>	129
I. 1. 3. <i>Construction de la banque de plasmides proies</i>	131
I. 1. 4. <i>Crible deux-hybrides en levures</i>	133
I. 2. VALIDATION DES DIFFÉRENTS PARTENAIRES CELLULAIRES IDENTIFIÉS	134
I. 2. 1. <i>Les partenaires déjà connus dans la littérature</i>	136
I. 2. 2. <i>Les nouveaux partenaires cellulaires des protéines EBNA3</i>	136
I. 2. 2. 1. Protéines chaperonnes et complexe SCF	137
I. 2. 2. 2. Interaction des EBNA3 avec des facteurs de Transcription	139
I. 2. 2. 3. Interaction des EBNA3 avec des protéines cellulaires impliquées dans la régulation de la stabilité de p53	145
I. 2. 2. 4. Les autres protéines cellulaires impliquées dans la régulation du cycle cellulaire	147
I. 2. 2. 5. Les autres protéines cellulaires	148
I. 2. 2. 6. Les faux positifs	150
I. 2. 2. 7. Les partenaires non testés en Co-IP	150
I. 3 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	151

II. ETUDE FONCTIONNELLE DE L'INTERACTION ENTRE LA PROTÉINE MIZ-1 ET EBNA-3A	155
II. 1. GENERALITES SUR LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION Miz-1	155
II. 1. 1. Miz-1 est un partenaire de l'oncoprotéine c-Myc	155
II. 1. 2. Structure de la protéine Miz-1	156
II. 1. 2. 1. Le domaine POZ	156
II. 1. 2. 2. Domaine de liaison à l'ADN de Miz-1	156
II. 1. 2. 3. Domaines d'interaction à l'oncoprotéine c-Myc	157
II. 1. 3. Miz-1 et la transcription	158
II. 1. 3. 1. Les mécanismes d'action du facteur de transcription Miz-1	158
II. 1. 3. 2. Les gènes cibles de Miz-1	159
II. 1. 3. 2. 1. La régulation du gène <i>CDKN2B</i> codant p15 ^{INK4B}	159
II. 1. 3. 2. 2. La régulation du gène <i>CDKN1A</i> codant p21 ^{CIP1}	160
II. 1. 3. 2. 3. La régulation du gène <i>bcl2</i>	162
II. 1. 3. 2. 4. Les autres gènes cibles de Miz-1	162
II. 1. 3. 3. Régulation de la protéine Miz-1	163
II. 1. 3. 3. 1. La localisation cellulaire de Miz-1	163
II. 1. 3. 3. 2. Réponse aux dommages à l'ADN	163
II. 1. 3. 3. 3. Réponse au TGF- β	163
II. 1. 4. La protéine Miz-1 est une protéine multifonctionnelle	164
II. 2. ARTICLE : EPSTEIN-BARR VIRUS NUCLEAR ANTIGEN 3A MODULATES CELLULAR GENE TRANSCRIPTION THROUGH INTERACTION WITH MIZ-1	165
	198
III. LA REGION D'HOMOLOGIE DES EBNA3: UNE PLATEFORME D'INTERACTION AVEC DE NOMBREUX PARTENAIRES CELLULAIRES	209
III. 1. CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE MCRC1 ET EBNA-3A	209
III. 2. CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE PPP5C ET EBNA-3A	211
III. 3. CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE NF-YA ET EBNA-3A	213
III. 4. CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE EBNA-3A ET EBNA-3C	215
III. 5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	217
CHAPITRE III : CONCLUSION GENERALE	219
PARTIE 2 : CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE EBNA1 ET RCC1	227
CHAPITRE I : INTRODUCTION SUR LA PROTEINE EBNA1	229
I. STRUCTURE DE LA PROTEINE D'EBNA-1	231
I. 1. LE DOMAINE GLYCINE-ALANINE DE LA PROTEINE EBNA-1	232
I. 2. DOMAINE DE DIMERISATION ET DE LIAISON A L'ADN D'EBNA-1	233
II. FONCTION DE LA PROTEINE EBNA-1 DANS LE MAINTIEN DE L'EPISOME VIRAL	235
II. 1. ROLE D'EBNA-1 DANS LA REPLICATION DU GENOME VIRAL	236
II. 1. 1. Interaction EBNA-1-ADN	236
II. 1. 2. Recrutement de protéines cellulaires sur l'oriP	237
II. 2. ROLE D'EBNA-1 DANS LE MAINTIEN DU GENOME VIRAL	238
II. 2. 1. Ségrégation de l'épisome d'EBV	238
II. 2. 2. Distribution des épisomes d'EBV dans les cellules filles	239
II. 2. 3. EBNA-1 interagit avec les chromosomes	239
II. 2. 4. Mécanismes d'attachement d'EBNA-1 aux chromosomes	240
III. CONCLUSION	241
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	243
CARACTERISATION DE L'INTERACTION ENTRE LA PROTEINE VIRALE EBNA-1 ET RCC1	245
I. EBNA-1 ET RCC1 INTERAGISSENT EN CELLULES HUMAINES	246
II. CARACTERISATION DES DOMAINES D'INTERACTION ENTRE LES DEUX PROTEINES	247
II. 1. Caractérisation du domaine d'interaction de RCC1 dans la protéine EBNA-1	248
II. 2. Caractérisation du domaine d'interaction d'EBNA-1 dans RCC1	250

CHAPITRE III : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	255
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	259
ANNEXE : ARTICLE SUPPLEMENTAIRE	317

Introduction générale sur le virus d'Epstein-Barr

I. Généralités sur le virus d'Epstein Barr

I. 1. Découverte du virus d'Epstein-Barr

C'est en 1958 qu'un chirurgien britannique, le Docteur Denis Burkitt décrivit pour la première fois un lymphome représentant la tumeur de l'enfant la plus répandue dans certaines régions d'Afrique (Burkitt, 1958). La distribution géographique de ce lymphome se confondait avec les zones d'endémies du paludisme dans les régions d'Afrique équatoriale, suggérant l'implication d'un agent infectieux (Burkitt, 1962). A la suite d'une conférence donnée à ce sujet par le Docteur Burkitt, Anthony Epstein et son étudiante Yvonne Barr s'intéressèrent à l'hypothèse de l'étiologie infectieuse de ce lymphome, appelé depuis lymphome de Burkitt (BL), et proposèrent une collaboration afin d'obtenir des biopsies tumorales.

En 1964, Epstein et Barr rapportèrent l'établissement des premières lignées cellulaires à partir de biopsie de BL (Epstein and Barr, 1964). L'examen en microscopie électronique de ces lignées cellulaires après plusieurs semaines de culture *in vitro* permit à Epstein, Achong et Barr d'observer des particules virales de types Herpes (Epstein et al., 1964). Cependant, bien que morphologiquement similaires à d'autres virus du groupe des Herpesvirus, ce virus n'avait pas d'effet cytopathique sur des cellules permissives aux autres membres connus de ce groupe (HSV1, HSV2, CMV et VZV) (Epstein et al., 1965). Il devait donc s'agir d'un nouveau virus qui fut nommé virus d'Epstein-Barr (EBV), encore appelé Human Herpesvirus 4 (HHV4). Fait intéressant, l'EBV a été le premier virus clairement associé à un cancer humain.

Rapidement après l'association d'EBV au lymphome de Burkitt, Werner et Gertrude Henle obtinrent des lignées cellulaires issues de BL provenant du laboratoire du Professeur Epstein. Une fois ces cellules en leur possession les Henle cherchèrent la présence, dans des sérums d'enfants africains atteints de BL, d'anticorps contre ce nouveau virus (Henle and Henle, 1966). Comme attendu, ils trouvèrent des anticorps dirigés contre les antigènes de l'EBV dans ces sérums d'enfants malades, mais aussi dans des sérums d'enfants et d'adultes sains provenant du monde entier, indiquant que l'infection par le virus d'Epstein-Barr est

ubiquitaire (plus de 90% de la population adulte mondiale est infectée) (Henle et al., 1969). De la même façon Lyod Old et ses collègues montrèrent que des sérums de patients Africains atteints du carcinome du nasopharynx (NPC) contenaient un taux élevé d'anticorps contre les antigènes d'EBV par rapport à des sérum d'individus sains (Old et al., 1966). Puis, à la fin des années 60, une technicienne travaillant dans le laboratoire des Henle développa les symptômes d'une mononucléose infectieuse (MNI). Avant ces symptômes, cette technicienne ne présentait pas d'anticorps contre EBV, mais après ces symptômes, des anticorps dirigés contre EBV apparurent. Ceci permit de découvrir que l'EBV est l'agent causal de la mononucléose infectieuse (Henle et al., 1968). Enfin, dans les années 1970, différentes équipes mirent en évidence l'une des propriétés fondamentales de l'EBV : son pouvoir oncogène. En effet, EBV possède la capacité d'infecter et d'induire la prolifération continue de lymphocytes B *in vitro* (Henle et al., 1967; Gerber et al., 1969; Miller et al., 1971).

Depuis, EBV a été associé au développement de nombreux cancers avec une incidence plus ou moins forte en fonction du type de cancer. Ainsi, depuis l'association d'EBV au lymphome de Burkitt et au carcinome du nasopharynx, EBV a été impliqué dans une grande variété de maladies humaines. EBV est retrouvé dans des tumeurs d'origine lymphocytaire comme le lymphome de Hodgkin et des lymphomes de cellules T et NK et d'origine épithéliale tels que certains carcinomes gastriques. Le **tableau 1** contient une liste non exhaustive des pathologies associées à EBV. Cependant, bien que le virus soit associé à ces cancers, le rôle étiologique d'EBV dans l'émergence de la plupart de ces pathologies reste incertain.

I. 2. Classification d'EBV

Le virus d'Epstein-Barr appartient à la famille des *Herpesviridae* regroupant plus de 100 virus connus, infectant aussi bien les animaux que les êtres humains. A ce jour, huit Herpesvirus humains ont été découverts. Il s'agit des deux Herpes simplex de types 1 et 2 (HSV1 et HSV2), du virus de la Varicelle et du Zona (VZV), du cytomégalovirus (CMV), du virus d'Epstein-Barr (EBV) et des Herpesvirus HHV6, HHV7 et HHV8 (KSHV). Les Herpesvirus sont classés en trois sous-familles α , β , et γ , en fonction de leurs propriétés biologiques telles que le tropisme cellulaire *in vivo*, les caractéristiques de culture *in vitro*, la vitesse de répllication du génome viral, ainsi que la taille et la structure de ce dernier.

Pathologie	Sous-type	Association à EBV	Notes
Lymphome de Burkitt	Endémique	95-100 %	Afrique et Nouvelle Calédonie
	Sporadique	20-30 %	
Mononucléose Infectieuse		100 %	
Carcinome du Nasopharynx		100 %	Près de 100 % d'association avec les types II et III. Les types I sont retrouvés associés à EBV dans les régions endémiques (Asie du Sud-Est et Afrique du nord)
Lymphome de Hodgkin	Déplétion Lymphocytaire	> 95 %	
	Cellularité mixte	70 %	
	Scléronodulaire	20-40 %	
	Prédominance Lymphocytaire	< 5%	
Le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X		100 %	
Lymphoprolifération chez les individus immunodéprimés	Lymphoprolifération du post-transplanté	80 %	
	Lymphome de Burkitt	30-50 %	
	Lymphome Non Hodgkinien	30-50 %	
Autres pathologies chez les individus immunodéprimés	Léiomyosarcome	100%	Tumeurs des muscles lisses retrouvées principalement chez l'enfant
	Leucoplasie orale chevelue	100 %	
Lymphome de cellules T			
	Lymphome T/NK nasaux	100 %	
Carcinome gastrique	Indifférencié	100 %	
	Adenocarcinome	5-15 %	
Cancer du sein		0-50 %	

Tableau 1. Les différentes pathologies associées au virus d'Epstein-Barr.

Les α -Herpesvirus (**Tableau 2**) peuvent infecter un large spectre de types cellulaires. Ils ont un cycle réplcatif très rapide (24h à 48h) et productif avec destruction cellulaire importante. L'infection latente siège essentiellement *in vivo* dans les ganglions nerveux sensitifs.

Nom formel	Nom courant	Abréviations	Genre	Taille du Génome (Kpb)	Principales pathologies associées
Human Herpesvirus 1	Herpes simplex virus 1	HHV1 ou HSV1	Simplexvirus	153	Herpès Labial Encéphalites sévères Kératites
Human Herpesvirus 2	Herpes simplex virus 2	HHV2 ou HSV2		156	Herpès génital Herpès néonatal
Human Herpesvirus 3	Varicella Zoster virus	HHV3 ou VZV	Varicellovirus	134	Varicelle Zona

Tableau 2. Les α -Herpesvirus Humains.

Les β -Herpesvirus (**Tableau 3**) possèdent un spectre d'hôte intermédiaire. Ils ont un cycle réplcatif lent (plusieurs jours), peu cytolitique et une latence dans les leucocytes. L'infection par les β -Herpèsvirus est souvent asymptomatique chez les sujets immunocompétents mais potentiellement grave chez les sujets immunodéprimés.

Nom formel	Nom courant	Abréviations	Genre	Taille du Génome (Kpb)	Principales pathologies associées
Human Herpesvirus 5	Human Cytomegalovirus	HHV5 ou CMV	Cytomegalovirus	229	Syndrome mononucléosique Hépatite Rétinite Pneumonie
Human Herpesvirus 6	Human Herpesvirus 6	HHV6	Roseolovirus	160	Pathologies neurologiques Roséole
Human Herpesvirus 7	Human Herpesvirus 7	HHV7		145	Roséole

Tableau 3. Les β -Herpesvirus Humains.

Les γ -Herpesvirus (**Tableau 4**) ont un spectre d'hôte étroit. Ils ont un cycle réplcatif long, une latence principalement dans les lymphocytes B et un grand pouvoir oncogène. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) fait partie de la famille des γ -Herpesvirus humains.

Nom formel	Nom courant	Abréviations	Genre	Taille du Génome (Kpb)	Principales pathologies associées
Human Herpesvirus 4	Epstein-Barr Virus	HHV4 ou EBV	Lymphocryptovirus	172	Mononucléose infectieuse Nombreux cancers
Human Herpesvirus 8	Kaposi's Sarcoma associated HerpesVirus	HHV8 ou KSHV	Rhadinovirus	170	Sarcome de Kaposi associé au SIDA Maladie de Castleman Lymphome des séreuses

Tableau 4. Les γ -Herpesvirus Humains.

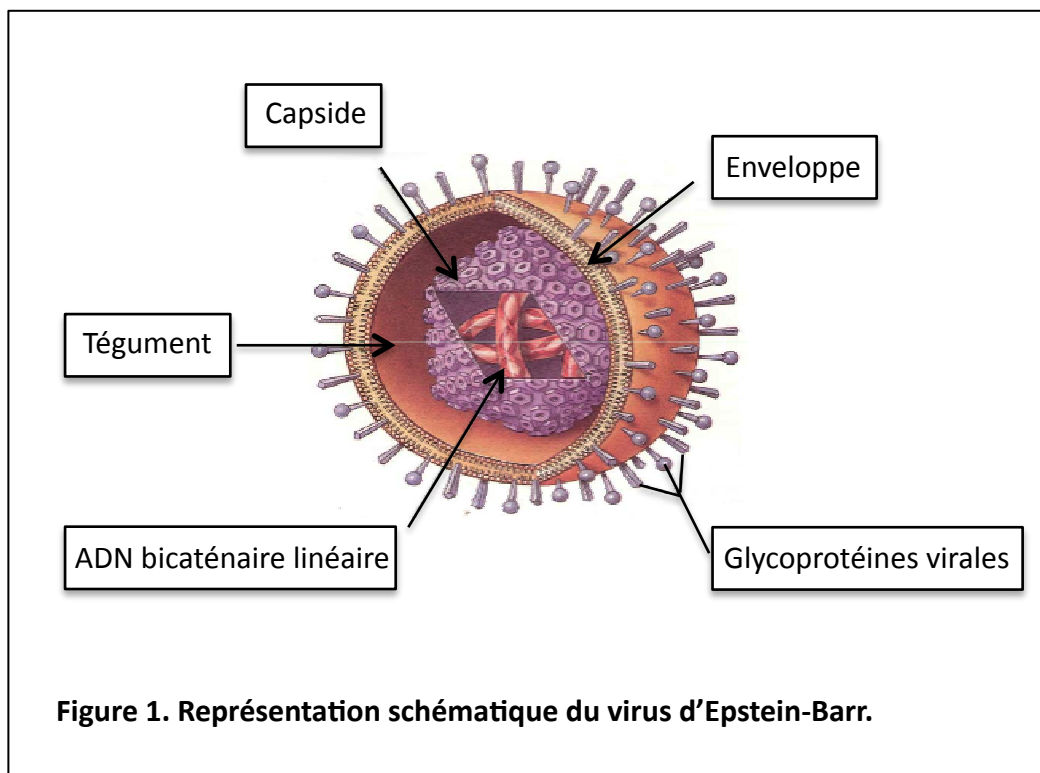
II. Caractéristiques du virus d'Epstein-Barr

II. 1. Structure du Virion

Le virus d'Epstein-Barr appartient à la grande famille des Herpesvirus et possède donc les caractéristiques structurales communes à cette famille de virus. Le virion est sphérique, et comprend quatre composants majeurs : le génome viral, la capside, le tégment et l'enveloppe (**Fig 1**). Le génome d'EBV est composé d'une molécule d'ADN linéaire double brin et est entouré par une structure protéique, la capside. Cette capside, de symétrie icosaédrique, a un diamètre de 100 à 120 nm et est composée de 162 sous-unités ou capsomères (150 hexamères et 12 pentamères). Le tégment, qui entoure la capside, contient des protéines virales et cellulaires (Johannsen et al., 2004). Enfin, l'enveloppe lipidique portant des glycoprotéines virales entoure l'extérieur du tégment.

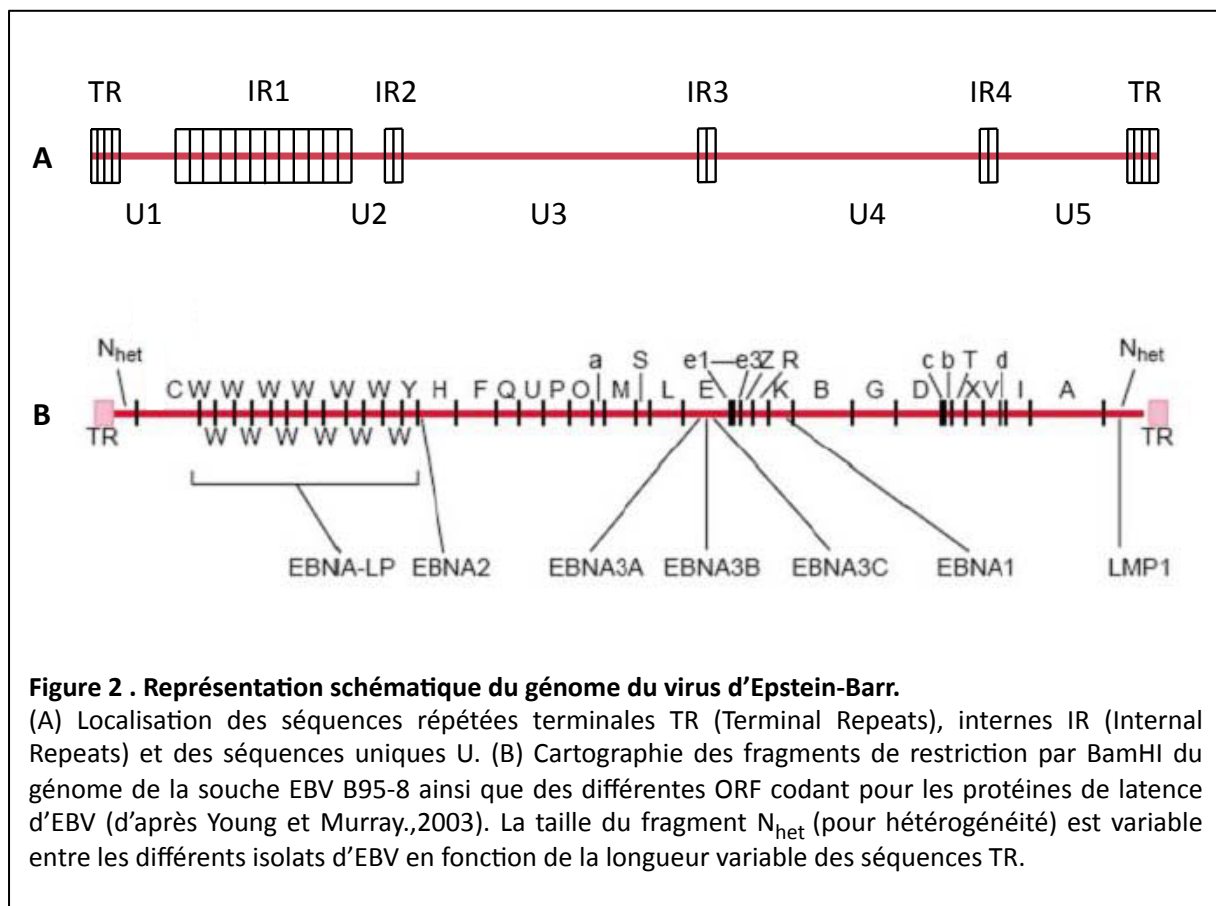
II. 2. Le génome viral

En 1984, le génome d'EBV a été entièrement séquencé à partir de la souche B95-8 (Baer et al., 1984), souche provenant d'une lignée lymphoïde de marmouset infectée par EBV (Miller et al., 1972). Le génome d'EBV est une longue molécule d'ADN bicaténaire d'environ 172 Kpb (souche B95-8) portant à chacune de ses extrémités des séquences répétées terminales (TR : Terminal Repeats) constituées de 4 à 12 répétitions (selon les souches virales) en tandem d'une séquence de 530 pb. Cette structure permet au génome de se circulariser après l'entrée dans la cellule hôte, formant ainsi un épisode. Il a été montré que dans la majorité des cas le génome viral reste sous forme épisomale et n'est que rarement intégré.



Le génome d'EBV est formé de deux régions de séquences dites uniques, une séquence unique de 12 kpb (US pour « Unique Small ») et une séquence unique de 126 kpb (UL pour « Unique Long »), séparées par 7 à 12 copies de séquences de 3 kpb répétées en sens direct (IR1 pour « Internal Repeat 1 »). Enfin, la grande région de séquence unique UL est elle-même sous-divisée en quatre domaines (U2 à U5), délimités par de courts éléments répétés (IR2, IR3 et IR4) (**Fig 2A**).

La digestion par l'enzyme de restriction BamHI a permis de cartographier le génome viral de la souche de référence B95-8 en fragments de restriction par taille décroissante suivant l'ordre alphabétique, de A à Z puis de a à h (Baer et al., 1984) (**Fig 2B**). Ce classement est à la base de la nomenclature des phases de lectures ouvertes (ORF pour « Open Reading Frame ») présentes dans le génome viral. Ainsi, plus d'une centaine de phases ouvertes de lecture ont pu être mises en évidence et répertoriées selon : (i) le fragment de restriction BamHI dans laquelle elles démarrent (de A à Z), (ii) leur sens de lecture soit vers la gauche par la lettre L (Leftward) soit vers la droite par la lettre R (Rightward), (iii) leur position dans ce fragment. Pour exemple, BERF1 (pour **B**amHI **E** **R**ightward **F**rame **1**) est la première phase de lecture, transcrite vers la droite du fragment E de restriction BamHI.



II. 3. Polymorphisme génétique d'EBV

Le génome d'EBV possède un certain nombre de séquences répétées au niveau des régions IR et TR, pouvant donner lieu à un polymorphisme. Si le nombre de répétitions dans ces régions est en moyenne stable pour une souche virale donnée, il varie selon les isolats et peut donc être utilisé à des fins épidémiologiques. On distingue principalement deux isolats pour l'EBV, désignés EBV-1 et EBV-2 (ou EBV de type A et EBV de type B) dont les prototypes sont respectivement la souche B95-8 (Miller et al., 1972; Miller and Lipman, 1973) et la souche AG876 (Pizzo et al., 1978). Il a été montré que les souches d'EBV-2 induisent en général une prolifération lymphocytaire moins marquée que celle engendrée avec l'EBV-1. En effet, ces deux isolats présentent une grande homologie de séquence exceptée pour les gènes codant les protéines de latence EBNA2, -3A, -3B, -3C et -LP ainsi que les petits ARNs latents non polyadénylés, les EBER-1 et -2. Les différences les plus marquées ont été observées pour les protéines EBNA2 avec 47 % de divergence en acides aminés, ainsi que pour les protéines de la famille EBNA3, EBNA-3A, -3B et -3C avec une divergence de

respectivement 16%, 20% et 28% (Dambaugh et al., 1984; Rowe et al., 1989; Sample et al., 1990). Ces divergences expliquent pourquoi l'EBV-1 permet de transformer les lymphocytes B avec une meilleure efficacité que l'EBV-2. Des études de séroprévalence ont montré que l'EBV-1 est majoritaire en Occident, alors qu'en Afrique et en Nouvelle Guinée, les types 1 et 2 sont présents avec la même fréquence.

Enfin, certaines grandes délétions sont aussi observées dans les génomes des principales souches virales de laboratoire (P3HR-1, Daudi ou B95-8) avec des effets plus ou moins importants selon les régions impliquées. Par exemple, le prototype B95-8 est affecté d'une délétion de 11,8 Kpb sans conséquence notable sur les fonctions virales *in vitro*. Par contre, l'absence de certaines séquences génomiques de la souche P3HR-1 la rend incapable d'immortaliser des lymphocytes B *in vitro*.

II. 4. Les voies de transmission d'EBV

Les données épidémiologiques semblent indiquer que la transmission du virus se fait essentiellement par l'intermédiaire de la salive. Ce mode de contamination peut donc facilement expliquer le caractère ubiquitaire et précoce de l'infection par le virus d'Epstein-Barr. Cependant, des cas de transmission du virus par transfusion, voie sexuelle et transplantation d'organes ont aussi été rapportés (Gerber et al., 1969; Gratama et al., 1988; Näher et al., 1992; Higgins et al., 2007).

III. Infection par le virus d'Epstein-Barr

Une caractéristique commune de l'ensemble des Herpesvirus est la capacité, après la primo-infection, d'établir une phase de latence pouvant être entrecoupée de réactivations : on parle alors de phase productive ou cycle lytique.

III. 1. La phase de Latence

La latence virale est caractérisée par le maintien du génome viral dans la cellule hôte en absence de production de nouvelles particules virales infectieuses. Cette latence est la situation la plus fréquemment observée dans les cellules infectées par EBV *in vitro* et *in vivo*.

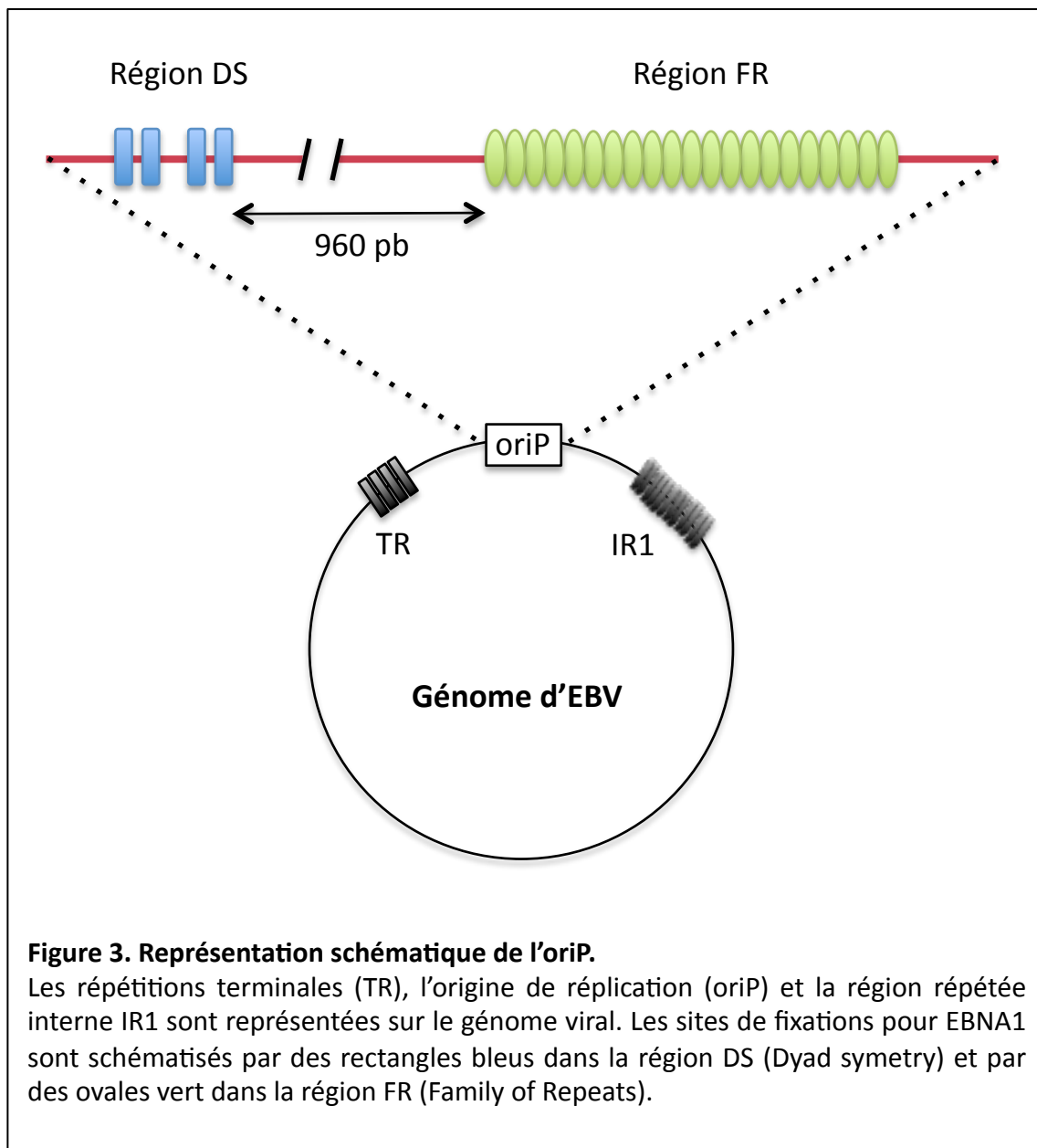
Dans ces cellules, le génome viral est maintenu dans le noyau sous forme épisomale multicopie et un nombre limité de gènes, caractéristiques des différentes formes de latence, est exprimé. L'essentiel des connaissances acquises sur le cycle biologique d'EBV est issu d'expériences conduites *in vitro* sur des lignées cellulaires immortalisées par EBV. Dans la majorité des cas il s'agit de lignées de cellules B dérivant de tumeurs ou de lignées lymphoblastoïdes établies à partir de lymphocytes B naïfs. En effet, *in vitro*, EBV a la capacité d'infecter et d'activer les lymphocytes B quiescents et d'induire leur prolifération continue. Cette activation est visible 24 heures post-infection et se caractérise par une augmentation de la taille des cellules infectées ainsi que par la formation d'agrégats cellulaires.

La mise en place de cette phase de latence requiert le maintien du génome viral épisomal dans la cellule infectée. L'épisome viral est répliqué par l'ADN polymérase cellulaire en même temps que le génome cellulaire, au cours de la phase S (Hampar et al., 1974). La séquence agissant en *cis* dans la répllication de l'épisome viral est appelée *oriP* (origine de répllication Plasmidique) (Yates et al., 1984). L'*oriP* est composée de deux éléments appelés FR (Family of Repeats) et DS (Dyad Symetry) séparés de 960 pb (Reisman et al., 1985) (**Fig 3**). Une seule protéine virale est nécessaire à son activité, la protéine EBNA1 (Yates et al., 1985). Enfin, bien que l'ADN viral soit le plus souvent retrouvé sous forme d'épisome, certaines formes d'intégration dans le génome cellulaire ont été décrites (Matsuo et al., 1984; Hurley et al., 1991).

III. 1. 1. La Latence de type III et l'immortalisation des cellules B *in vitro*

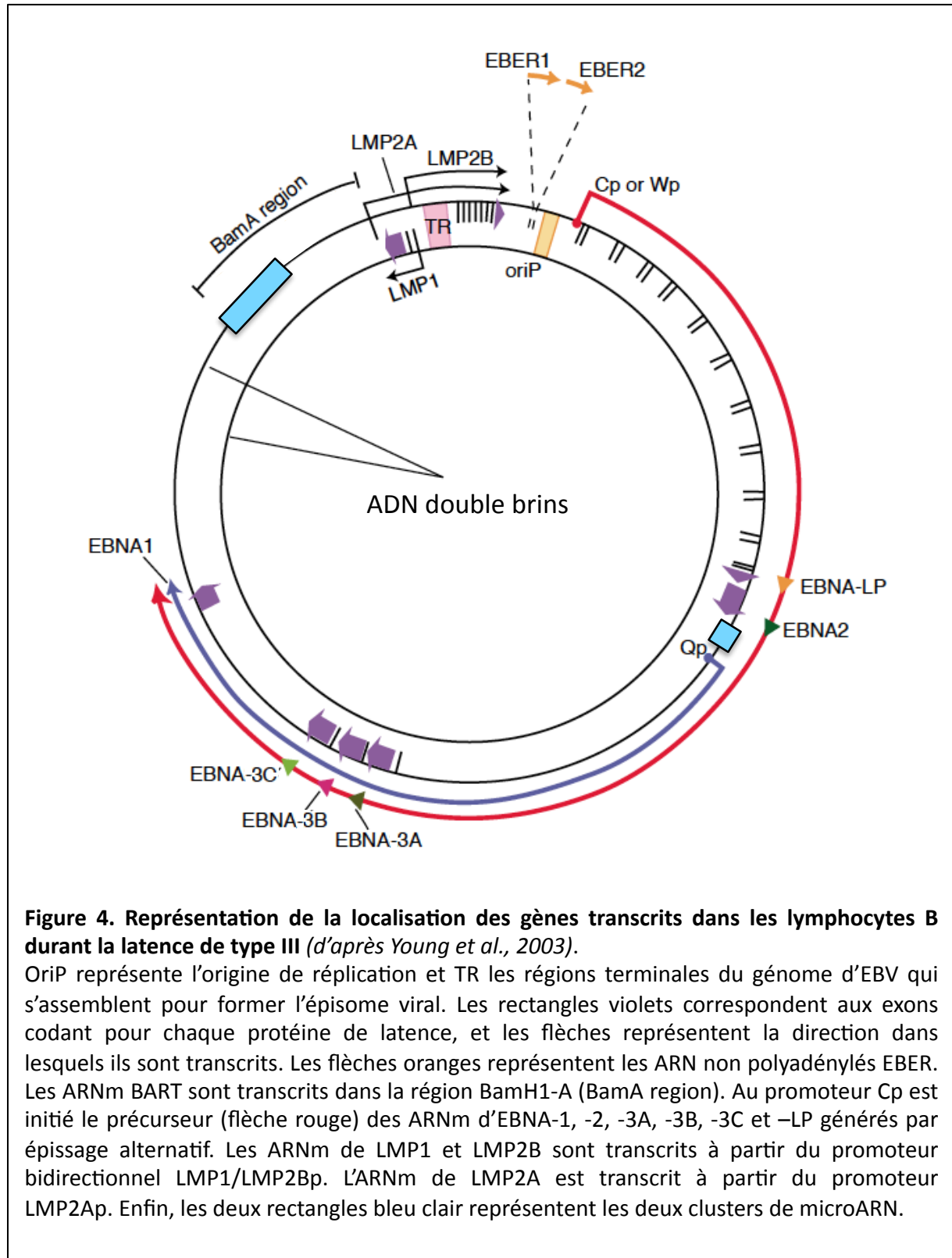
Les lignées de cellules immortalisées par EBV *in vitro* sont appelées lignées lymphoblastoïdes (LCL). Dans ces cellules le virus persiste dans un état dit de latence III, défini par l'expression d'un certain nombre de produits viraux dont six protéines nucléaires (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP) et trois protéines membranaires (LMP1, -2A et -2B). En plus de ces protéines virales, les LCL expriment en grande quantité deux petits ARN messagers non-polyadénylés, EBER-1 et -2. La fonction de ces transcrits n'est pas encore claire mais ils sont retrouvés dans tous les différents types de latence et servent couramment de marqueur pour la détection d'EBV dans des tumeurs. Des ARNm transcrits au niveau de la région BamH1-A du génome viral (aussi appelés BART) ont été retrouvés dans des LCL, mais aussi dans toutes les autres formes de latence (Brooks et al., 1993). Enfin, des microARN sont aussi retrouvés exprimés lors de la latence de type III. La localisation ainsi

que l'orientation des ces différents gènes de latence sur le génome viral sont illustrées dans la **figure 4**.



A l'origine, l'utilisation de virus recombinants dans lesquels les gènes de latence ont été enlevés un par un a permis de mettre en évidence que les protéines EBNA1, EBNA2, EBNA-3A, EBNA-3C et LMP1 sont essentielles à l'immortalisation *in vitro* par le virus d'Epstein-Barr (Cohen et al., 1989; Tomkinson and Kieff, 1992b; Kaye et al., 1993, 1995; Longnecker et al., 1993b; Tomkinson et al., 1993). Cependant, depuis quelques années le rôle essentiel de la protéine EBNA-3A est remis en question. Une fois immortalisées, ces LCL expriment un grand nombre de marqueurs d'activation de lymphocytes B tels que le CD23, le

CD30, le CD39 et le CD70 ainsi que les molécules d'adhésions LFA1, LFA3 (CD58) et ICAM1 (Calender et al., 1987; Rowe et al., 1987; Billaud et al., 1990).

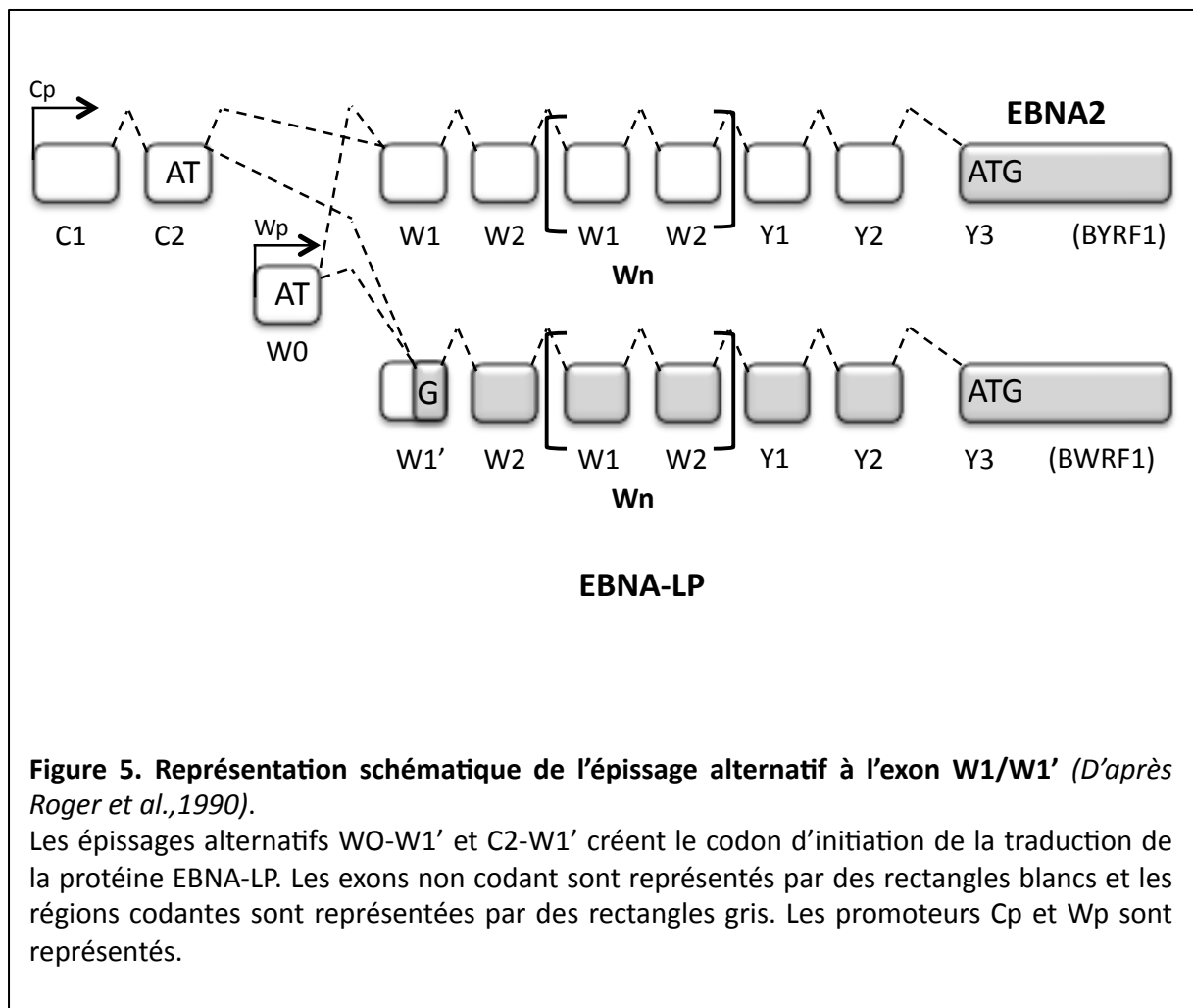


III. 1. 1. 1. Les protéines nucléaires

III. 1. 1. 1. 1. La transcription des EBNA

Les six protéines EBNA sont traduites à partir d'ARNm distincts issus d'un épissage différentiel d'une seule et même unité transcriptionnelle recouvrant plus de 100 kpb du génome viral. Leur transcription peut être initiée au niveau de deux promoteurs, soit le promoteur Cp (Bodescot et al., 1987), soit le promoteur Wp (Sample et al., 1986), de façon mutuellement exclusive (Woisetschlaeger et al., 1989) (**Fig 4**).

Après infection des cellules B par le virus d'Epstein-Barr, la transcription du génome viral est tout d'abord initiée au promoteur Wp présent dans la région de répétitions IR1 (Alfieri et al., 1991). L'activité de ce promoteur Wp ne requiert pas de facteurs viraux, mais la seule présence de facteurs cellulaires. Ces premiers transcrits commencent par l'exon W0 suivi de plusieurs exon W1-W2 provenant de l'IR1 et contenant la séquence codante pour la protéine virale EBNA-LP (Speck and Strominger, 1985; Sample et al., 1986) (**Fig 5**).

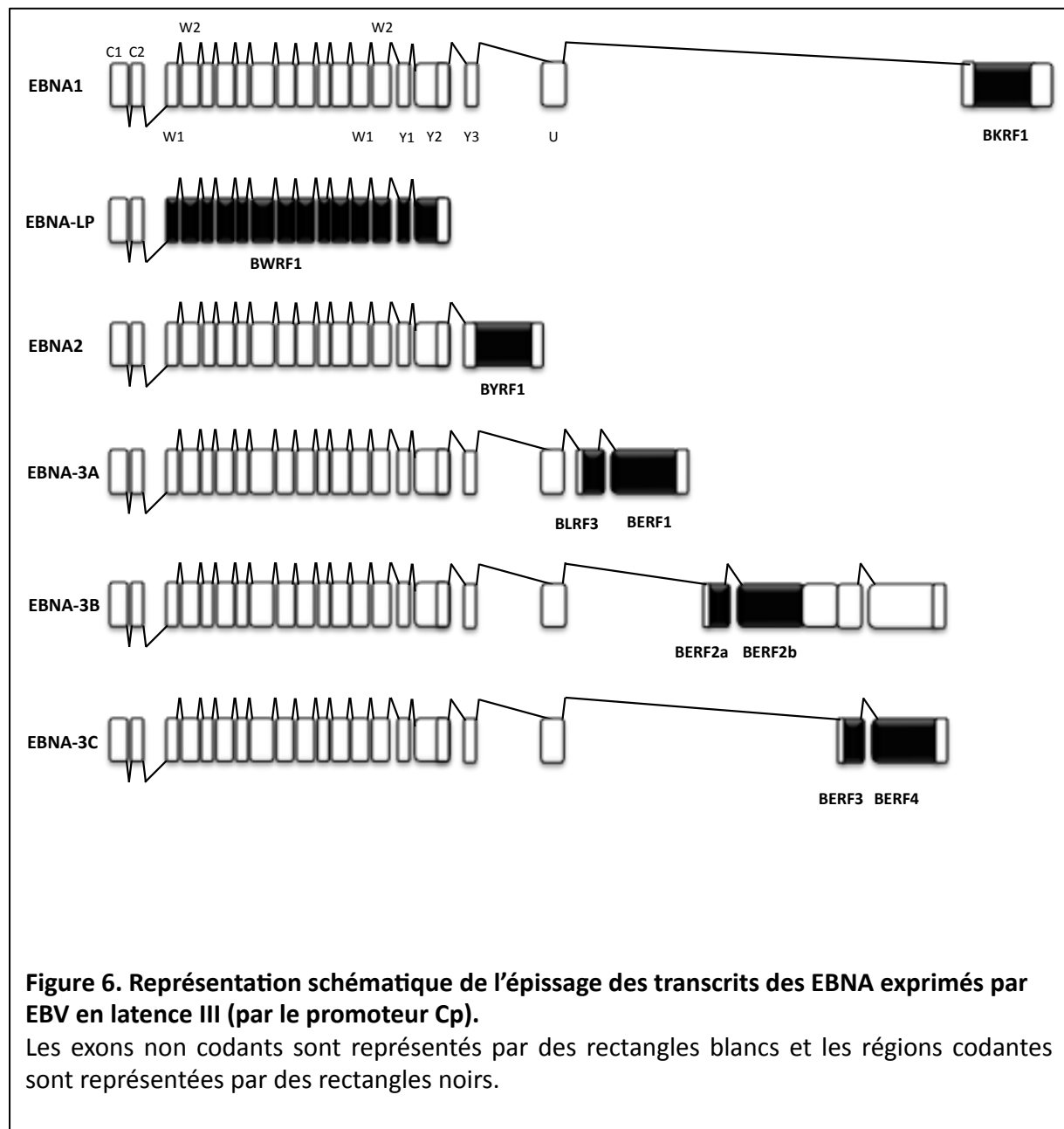


Le dernier exon W2 est épissé aux exons Y1 et Y2 et enfin à Y3 qui contient la phase de lecture ouverte codant pour la protéine EBNA2. Il existe par ailleurs un épissage alternatif conduisant à l'expression d'un ARNm codant ou non pour la protéine EBNA-LP. En effet, l'épissage alternatif de l'exon W0 à W1', dont le site accepteur d'épissage se situe 5 pb en aval de celui de W1, génère un codon d'initiation de la traduction pour la protéine EBNA-LP. Cet épissage alternatif conduit à un messenger bicistronique codant pour EBNA-LP dans sa partie 5' et pour EBNA2 dans sa partie 3'. Cependant, il semble que le produit principal de ce messenger soit la protéine EBNA-LP (Alfieri et al., 1991). L'épissage de l'exon W0 à W1 ne génère pas de codon d'initiation de la traduction pour la protéine EBNA-LP et ce messenger ne code donc que pour la protéine EBNA2 (Rogers et al., 1990). Ces protéines virales, EBNA-LP et EBNA2, sont les deux premiers antigènes viraux exprimés durant la latence (Allday et al., 1989; Alfieri et al., 1991).

Dans certains transcrits, un site donneur d'épissage situé au début de l'exon Y3 est activé et épissé à l'exon U. Cet exon U est à son tour épissé alternativement à l'un des quatre sites accepteur d'épissage qui contiennent la partie 5' de la phase de lecture ouverte d'EBNA-3A, -3B, -3C ou d'EBNA1 (**Fig 6**). Il est à noter que le transcrit codant pour la protéine EBNA-3B contient aussi les ORF BERF3 et BERF4 (codant pour EBNA-3C) (Baer et al., 1984; Sample and Kieff, 1990). En effet, il semble qu'il n'y ait pas de séquence de polyadénylation à la suite de l'ORF BERF2b (codant EBNA-3B). Les ARNm codant pour les protéines EBNA-3A, -3B, -3C et EBNA1 sont beaucoup moins abondants que ceux codant pour EBNA-LP et EBNA2 (Sample and Kieff, 1990). Enfin, tous les antigènes nucléaires de la phase de latence d'EBV sont détectés environ 20 heures après l'infection (Allday et al., 1989).

Quelques jours après le début de l'infection, l'initiation de la transcription des EBNA passe du promoteur Wp au promoteur Cp (Woisetschlaeger et al., 1990). Ce changement de promoteur coïncide avec la méthylation progressive de l'ADN au promoteur Wp (Tierney et al., 2000). Le promoteur Cp contient des séquences « enhancers » spécifiques d'EBNA2 (Woisetschlaeger et al., 1991; Schlager et al., 1996). Il a donc été proposé que ce soit la protéine virale EBNA2 qui, une fois exprimée à un niveau suffisant, permette ce changement de promoteur. Les transcrits initiés au promoteur Cp commencent par deux courts exons, C1 et C2, qui sont ensuite épissés alternativement à l'exon W1 ou W1' comme les transcrits initiés à Wp (**Fig 5**). Il est cependant intéressant de noter qu'il a récemment été montré que le promoteur Wp n'est jamais complètement éteint et que des transcrits provenant de ce

promoteur sont toujours trouvés dans des cellules immortalisées par EBV (Elliott et al., 2004; Hutchings et al., 2006).



III. 1. 1. 1. 2. La protéine EBNA1

EBNA1 est codée par la phase de lecture BKR1F1 qui contient la région répétée IR3. Du fait du polymorphisme de cette région, EBNA1 a un poids moléculaire variant entre 65 et 85 kDa suivant les souches virales (Hennessy et al., 1983). EBNA1 est une phosphoprotéine liant l'ADN (Rawlins et al., 1985; Jones et al., 1989) qui est essentielle pour le maintien et la réplication de l'épisome viral (Yates et al., 1984). De plus, la protéine EBNA1 joue un rôle

dans la transcription des EBNA à partir du promoteur Cp (Reisman and Sugden, 1986; Kennedy and Sugden, 2003). Cette protéine est présente dans toutes les cellules infectées par EBV. La protéine EBNA1 est séparée en domaine N et C-Terminal par une grande région comportant des répétitions Glycine-Alanine (Gly-Ala), région variant de taille en fonction des souches d'EBV. Cette séquence Gly-Ala est connue pour inhiber la présentation d'antigènes par le CMH de classe I ainsi que la dégradation d'EBNA1 par le protéasome (Levitskaya et al., 1995, 1997).

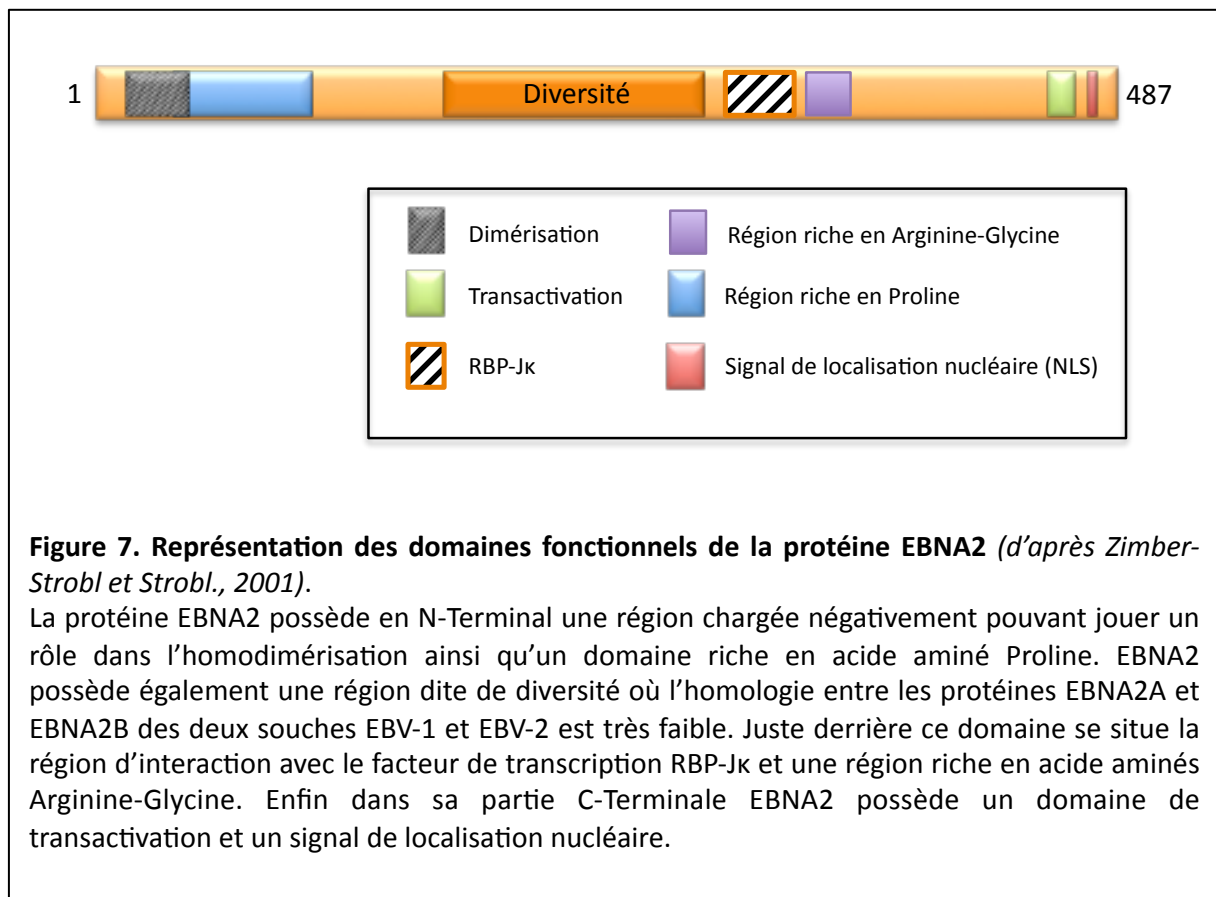
De par son rôle dans le maintien du génome viral dans la cellule infectée, EBNA1 est essentielle à l'immortalisation des lymphocytes B. Les différentes fonctions de la protéine EBNA1 seront détaillées plus en détail dans la partie II de ma thèse.

III. 1. 1. 1. 3. La protéine EBNA2

Le virus d'Epstein-Barr est capable d'immortaliser des lymphocytes B quiescents *in vitro* et la protéine EBNA2 est l'une des protéines virales indispensables à ce processus. La protéine EBNA2, codée par l'ORF BYRF1, est la première protéine du virus à être produite lors de l'infection (Allday et al., 1989). L'incapacité d'une souche d'EBV, la souche P3HR-1, à immortaliser des cellules B *in vitro* fut la première indication d'un rôle essentiel d'EBNA2 (Rabson et al., 1982; Cohen et al., 1989; Hammerschmidt and Sugden, 1989). En effet, le génome de la souche PRHR-1 comporte une délétion du gène codant pour la protéine EBNA2 ainsi que des deux derniers exons codant pour EBNA-LP. La restauration du gène codant pour EBNA2 dans cette souche P3HR-1 permet à nouveau l'immortalisation des cellules B (Cohen et al., 1989). Il a de plus été montré que la protéine EBNA2, en coopération avec EBNA-LP, induit la transition des cellules infectées de la phase G₀ à G₁ (Sinclair et al., 1994). Enfin, la protéine EBNA2 est le déterminant principal de la différence biologique qui permet aux souches EBV-1 de transformer les lymphocytes B primaires avec une meilleure efficacité que les souches EBV-2. En effet, ces deux souches virales diffèrent principalement au niveau de leurs séquences codantes pour la protéine EBNA2 (Dambaugh et al., 1984; Adldinger et al., 1985) qui ne sont identiques qu'à 53 %. De plus, l'introduction du gène EBNA2A de la souche EBV-1 ou EBNA2B de la souche EBV-2 dans la souche P3HR-1 permet l'obtention de virus recombinants et immortalisants qui ont les mêmes caractéristiques de croissance que la souche EBV-1 ou EBV-2 en fonction du type d'EBNA2 réintroduit (Cohen et al., 1989).

Ceci montre donc que la protéine EBNA2 est bien le déterminant majeur des différences observées entre ces deux souches.

La protéine EBNA2 est connue pour ses capacités transactivatrices et possède certaines caractéristiques communes aux facteurs de transcription comme un domaine de transactivation et un signal de localisation nucléaire (NLS) (**Fig 7**).



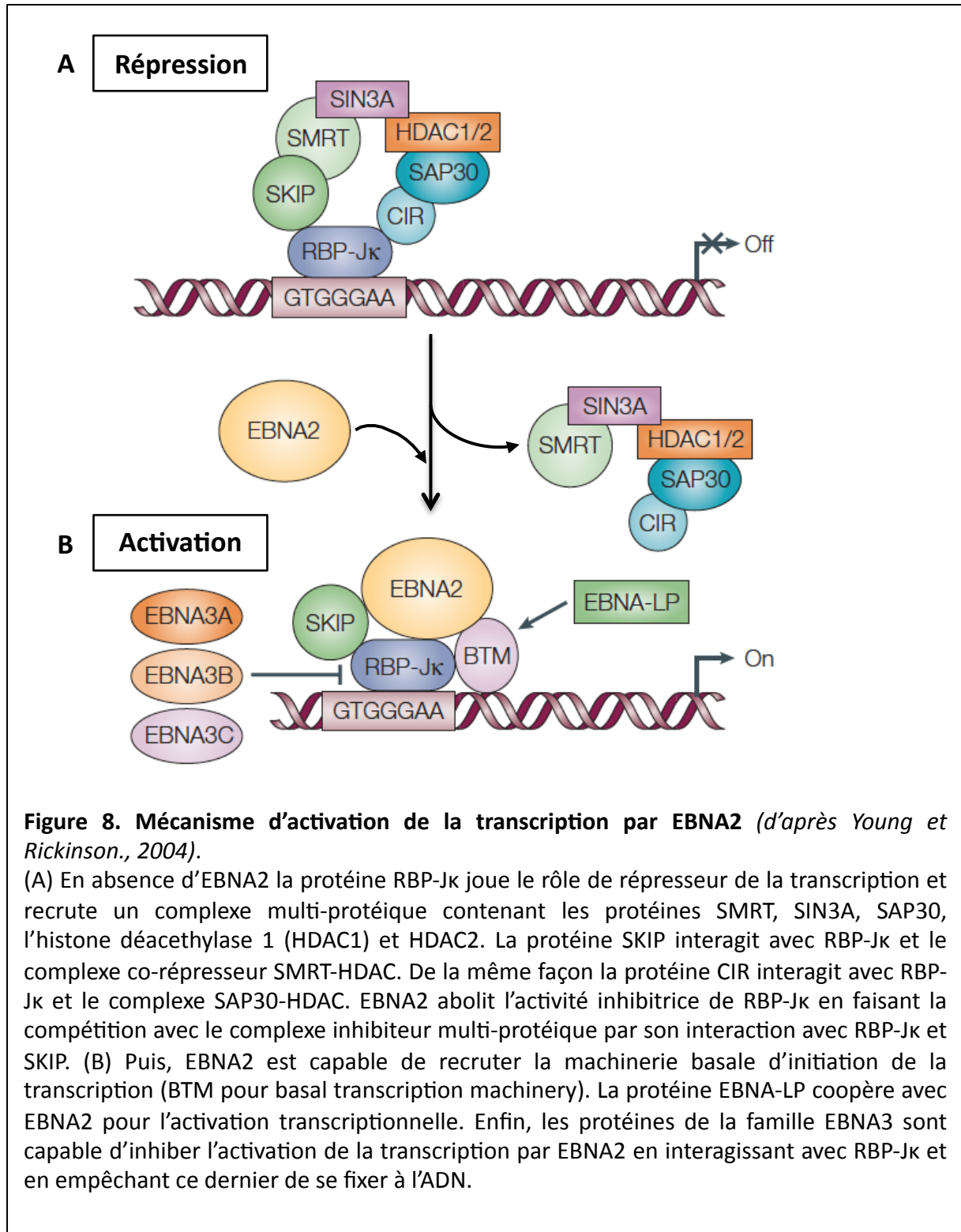
La protéine EBNA2 active la transcription de tous les autres gènes de latence exprimés dans des LCL en transactivant le promoteur Cp (Sung et al., 1991) (promoteur contrôlant l'expression de tous les EBNA) et les promoteurs des gènes codant les protéines membranaires de latence LMP1 et LMP2A/2B (Abbot et al., 1990; Fåhræus et al., 1990; Wang et al., 1990b; Zimber-Strobl et al., 1991; Laux et al., 1994b). De plus, EBNA2 contrôle l'expression d'un certain nombre de gènes cellulaires dont les antigènes de lymphocytes B CD21 (le récepteur pour l'EBV) (Cordier et al., 1990; Larcher et al., 1995) et CD23 (marqueur d'activation des lymphocytes B) (Wang et al., 1987, 1991). Contrairement à la plupart des facteurs de transcription traditionnels, EBNA2 ne se fixe pas directement à l'ADN mais active la transcription en interagissant avec des protéines adaptatrices qui elles fixent l'ADN. La protéine adaptatrice la plus étudiée pour EBNA2 est le facteur de transcription

RBP-J κ (aussi appelée CBF-1 pour Cp Binding Protein) (Ling et al., 1993; Grossman et al., 1994; Henkel et al., 1994; Waltzer et al., 1994, 1995; Zimmer-Strobl et al., 1994).

La protéine RBP-J κ joue le rôle de facteur de transcription dans la voie Notch, voie de signalisation contrôlant de nombreux processus cellulaires parmi lesquels la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Initialement caractérisée chez la drosophile, la voie Notch repose sur un récepteur transmembranaire, la protéine Notch. Une fois activé, son domaine intracellulaire est clivé et transloqué dans le noyau où il va jouer le rôle de facteur de transcription en s'associant avec la protéine RBP-J κ et ainsi réguler la transcription de certains gènes cellulaires. En interagissant avec RBP-J κ , la protéine EBNA2 est capable de remplacer la région intracellulaire de Notch (Sakai et al., 1998; Höfelmayr et al., 2001). Il a aussi été montré que le facteur RBP-J κ interagit avec des sites de fixation à l'ADN sur les promoteurs Cp, LMP1/LMP2Bp et LMP2Ap (Jin and Speck, 1992; Zimmer-Strobl et al., 1993; Grossman et al., 1994; Laux et al., 1994a; Johannsen et al., 1995; Sjöblom et al., 1995b) ainsi que sur le promoteur du gène cellulaire CD23 (Ling et al., 1994a). En absence de la protéine EBNA2, la protéine RBP-J κ agit comme un répresseur de la transcription en recrutant sur ses promoteurs cibles un complexe de protéines répresseur de la transcription (Waltzer et al., 1995; Kao et al., 1998; Hsieh et al., 1999) (**Fig 8**). EBNA2, en interagissant avec RBP-J κ , permet d'abolir l'inhibition exercée par ce dernier en déplaçant l'interaction avec le complexe répresseur (Hsieh and Hayward, 1995). La protéine EBNA2 est en plus capable, par l'intermédiaire de son domaine activateur, de recruter des facteurs permettant l'activation de la transcription dont les facteurs de la machinerie basale de transcription comme TFIIB et TFIIF (Tong et al., 1995a, 1995b, 1995c), les histones acétyltransférase p300/CBP et PCAF (Wang et al., 2000) et la protéine EBNA-LP qui agit comme un co-activateur d'EBNA2 (Harada and Kieff, 1997; Nitsche et al., 1997). De plus, par un autre domaine que son domaine d'activation la protéine EBNA2 peut recruter le complexe de remodelage de la chromatine hSWI/SNF, permettant à l'ADN d'être plus accessible aux facteurs de transcription (Wu et al., 1996, 2000a). Enfin, cet effet activateur de la protéine EBNA2 par l'interaction avec RBP-J κ est régulé négativement par les protéines virales de la famille EBNA3 (Waltzer et al., 1996), ainsi que par la protéine cellulaire KyoT2 (Taniguchi et al., 1998). Cette régulation négative de la transcription passe par la compétition avec EBNA2 pour l'interaction avec RBP-J κ ainsi que par la dissociation du facteur RBP-J κ de l'ADN.

Les éléments de réponse responsables de l'action d'EBNA2 ont été identifiés pour les promoteurs viraux Cp, LMP1/LMP2Bp et LMP2Ap (Fåhræus et al., 1990; Wang et al.,

1990b; Sung et al., 1991; Zimmer-Strobl et al., 1991; Laux et al., 1994b) ainsi que pour le promoteur cellulaire CD23 (Wang et al., 1991). Ces différents éléments de réponse sont assez larges et comportent tous au moins un site de fixation pour RBP-J κ .



L'interaction entre RBP-J κ et EBNA2 est essentielle à l'immortalisation des cellules B par EBV. En effet, alors que l'expression d'une protéine EBNA2 sauvage permet d'immortaliser des cellules B infectées par un virus EBV recombinant dont le génome est dépourvu du gène codant pour EBNA2, l'expression d'une protéine EBNA2 déficiente pour l'interaction avec RBP-J κ n'est plus capable d'immortaliser des cellules B infectées par le même virus recombinant (Yalamanchili et al., 1994). Cependant, si l'interaction entre EBNA2 et RBP-J κ est nécessaire, elle n'est pas suffisante pour activer complètement la transcription (Johannsen et al., 1995; Evans et al., 1996; Höfelmayr et al., 1999). Pour le promoteur bidirectionnel LMP1/LMP2Bp le facteur de transcription Spi-1/PU.1, interagissant aussi avec EBNA2, est nécessaire pour la transactivation régulée par EBNA2 (Laux et al., 1994a; Johannsen et al., 1995). De plus, Spi-B et une protéine à domaine POU sont aussi impliquées dans l'activation du promoteur par EBNA2 (Laux et al., 1994a; Sjöblom et al., 1995a). Au niveau du promoteur Cp, l'interaction de la protéine AUF1/hnRNP semble coopérer avec la protéine RBP-J κ dans la transactivation par EBNA2 (Fuentes-Pananá et al., 2000). Enfin pour le promoteur LMP2Ap il a été montré qu'en plus de RBP-J κ deux autres protéines sont capables de se fixer à la région contenant l'élément de réponse d'EBNA2 et de contribuer à l'activité d'EBNA2 (Höfelmayr et al., 1999). Cependant, ces deux protéines n'ont pas encore été identifiées.

La protéine EBNA2 joue un rôle dans l'activation d'un certain nombre de gènes cellulaires dont l'oncoprotéine c-Myc (Kaiser et al., 1999), BLR2 (Burgstahler et al., 1995) et le proto-oncogène c-fgr (Knutson, 1990; Patel et al., 1990). De plus, il a été montré qu'EBNA2 peut également être impliquée dans la répression de la transcription notamment celle des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (Jochner et al., 1996). De manière intéressante, il a été montré qu'EBNA2 se fixe à la protéine BS69 qui possède un rôle de répresseur de la transcription (Ansieau and Leutz, 2002). Il a notamment été montré que BS69 est capable d'inhiber l'activation de la transcription par EBNA2. Cependant, l'implication fonctionnelle de cette interaction dans les cellules B n'a pas encore été analysée.

EBNA2 est une phosphoprotéine (Grässer et al., 1991, 1992) et sa phosphorylation par la caséine kinase II est importante pour sa fonction dans la transformation cellulaire (Kwiatkowski et al., 2004). Lors de la latence, la phosphorylation d'EBNA2 est régulée durant le cycle cellulaire par le complexe CDK1/CyclineB1 qui phosphoryle EBNA2 lors de la mitose (Yue et al., 2004, 2006). Cette phosphorylation inhibe la capacité d'EBNA2 à activer les promoteurs LMP1/LMP2Bp et Cp. De manière intéressante le virus d'Epstein-Barr

possède un gène (BGLF4) codant pour une protéine Sérine/Thréonine Kinase exprimée durant le cycle lytique. Cette protéine kinase virale interagit et phosphoryle EBNA2 lors de la réactivation du virus, inhibant ainsi ses propriétés transactivatrices des gènes de latence (Yue et al., 2005).

Enfin, d'autres fonctions que celle de facteur de transcription ont été décrites pour la protéine EBNA2. Un rôle potentiel d'EBNA2 dans la maturation des ARNm a notamment été suggéré par le fait qu'EBNA2 interagisse avec une protéine de la famille des protéines DEAD-box, la protéine DEAD-box DP103 (Grundhoff et al., 1999). Cette famille de protéines est impliquée dans l'assemblage du spliceosome, l'épissage et l'export des ARNm. EBNA2 aurait aussi une fonction anti-apoptotique par son interaction avec la protéine Nur77 (Lee et al., 2002). La protéine Nur77 est un facteur de transcription qui, une fois transloqué du noyau vers le cytoplasme, permet le relargage du cytochrome c en réponse à des stimuli apoptotiques (Li et al., 2000). EBNA2 protégerait donc les cellules de l'apoptose en retenant Nur77 dans le noyau après des stimuli apoptotiques (Lee et al., 2002).

III. 1. 1. 1. 4. La protéine EBNA-LP

La protéine EBNA-LP (Leader Protein), encore appelée EBNA5, est codée par l'ORF BWRF1 composée d'un nombre variable d'exons W1 (de 66 pb) et W2 (132 pb) provenant de la région IR1 et de deux exons uniques Y1 et Y2 (Bodescot et al., 1984; Dillner et al., 1986). De ce fait, EBNA-LP est constituée dans sa partie N-Terminale d'une répétition de 66 acides aminés, 22 acides aminés codés par W1 et 44 acides aminés codés par W2, et d'une séquence unique de 35 acides aminés codée par les exons Y1 et Y2. La région contenant les deux derniers exons d'EBNA-LP, Y1 et Y2, ainsi que la séquence codante pour EBNA2 est absente du génome EBV de la souche P3HR-1, souche incapable d'immortaliser des cellules B *in vitro* (Rabson et al., 1982). La restauration du gène codant pour EBNA2 dans cette souche P3HR-1 permet à nouveau l'immortalisation des cellules B alors que la restauration du gène codant pour EBNA-LP n'a pas d'effet (Cohen et al., 1989; Hammerschmidt and Sugden, 1989). EBNA-LP n'est donc pas une protéine virale essentielle pour l'immortalisation des cellules B par EBV *in vitro*, mais en augmente significativement l'efficacité (Mannick et al., 1991; Allan et al., 1992).

La protéine EBNA-LP est une des premières protéines, avec EBNA2, à être exprimée lors de l'infection des cellules par EBV et elle coopère avec EBNA2 dans l'activation de la

transcription (Harada and Kieff, 1997; Nitsche et al., 1997) de par son interaction avec la protéine SP100 (Ling et al., 2005). Natamment, EBNA-LP coopère avec EBNA2 pour induire la transition des cellules infectées de la phase G₀ à G₁ (Sinclair et al., 1994). L'activité co-activatrice d'EBNA-LP est régulée par sa phosphorylation au cours du cycle cellulaire. Kitay et Rowe ont notamment montré qu'EBNA-LP est phosphorylée tout au long du cycle cellulaire et que cette phosphorylation augmente lors de la phase G₂ pour atteindre un maximum lors du passage G₂/M (Kitay and Rowe, 1996). Cette phosphorylation d'EBNA-LP, effectuée par la protéine kinase cellulaire CDK1 (Kato et al., 2003), est essentielle pour sa capacité à coopérer avec EBNA2 (Yokoyama et al., 2001). La protéine kinase virale BGLF4 est elle aussi capable de phosphoryler EBNA-LP au niveau du même site que la protéine kinase cellulaire CDK1 (Kato et al., 2003). Cependant on peut se demander quand cette interaction peut avoir lieu puisque cette protéine kinase virale est exprimée pendant le cycle productif d'EBV (Gershburg and Pagano, 2002) alors que la protéine EBNA-LP est elle une protéine de latence. Une des explications possible est que la protéine kinase BGLF4 est un des composants du tégument (Johannsen et al., 2004) et est donc présente dans les cellules nouvellement infectées par EBV.

Enfin, il a été montré que la protéine EBNA-LP interagit avec l'inhibiteur du cycle cellulaire p14^{ARF}, protéine pouvant induire un arrêt de la croissance et une mort des cellules. L'interaction d'EBNA-LP avec p14^{ARF} réduit de manière significative la mort induite par cette protéine (Kashuba et al., 2003). De plus EBNA-LP est capable d'interagir avec MDM2 et de former un complexe tri-moléculaire avec la protéine p53 (Kashuba et al., 2011). Il a notamment été montré que l'interaction d'EBNA-LP avec MDM2 inhibe la polyubiquitination de p53, inhibant sa dégradation mais aussi ses capacités de transactivateur (Kashuba et al., 2011). Par ces mécanismes EBNA-LP participerait à la survie des cellules immortalisées par EBV.

III. 1. 1. 1. 5. Les protéines EBNA3

Les protéines EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C, encore appelées respectivement EBNA3, EBNA4 et EBNA6 sont trois protéines différentes codées par des gènes qui pourraient avoir une origine commune. Sur les trois protéines, seules EBNA-3A et EBNA-3C sont importantes à l'immortalisation des cellules B *in vitro* par EBV. Les EBNA3 sont tout d'abord connues pour être des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de gènes viraux et cellulaires. De plus, les protéines de la famille EBNA3 interagissent avec de

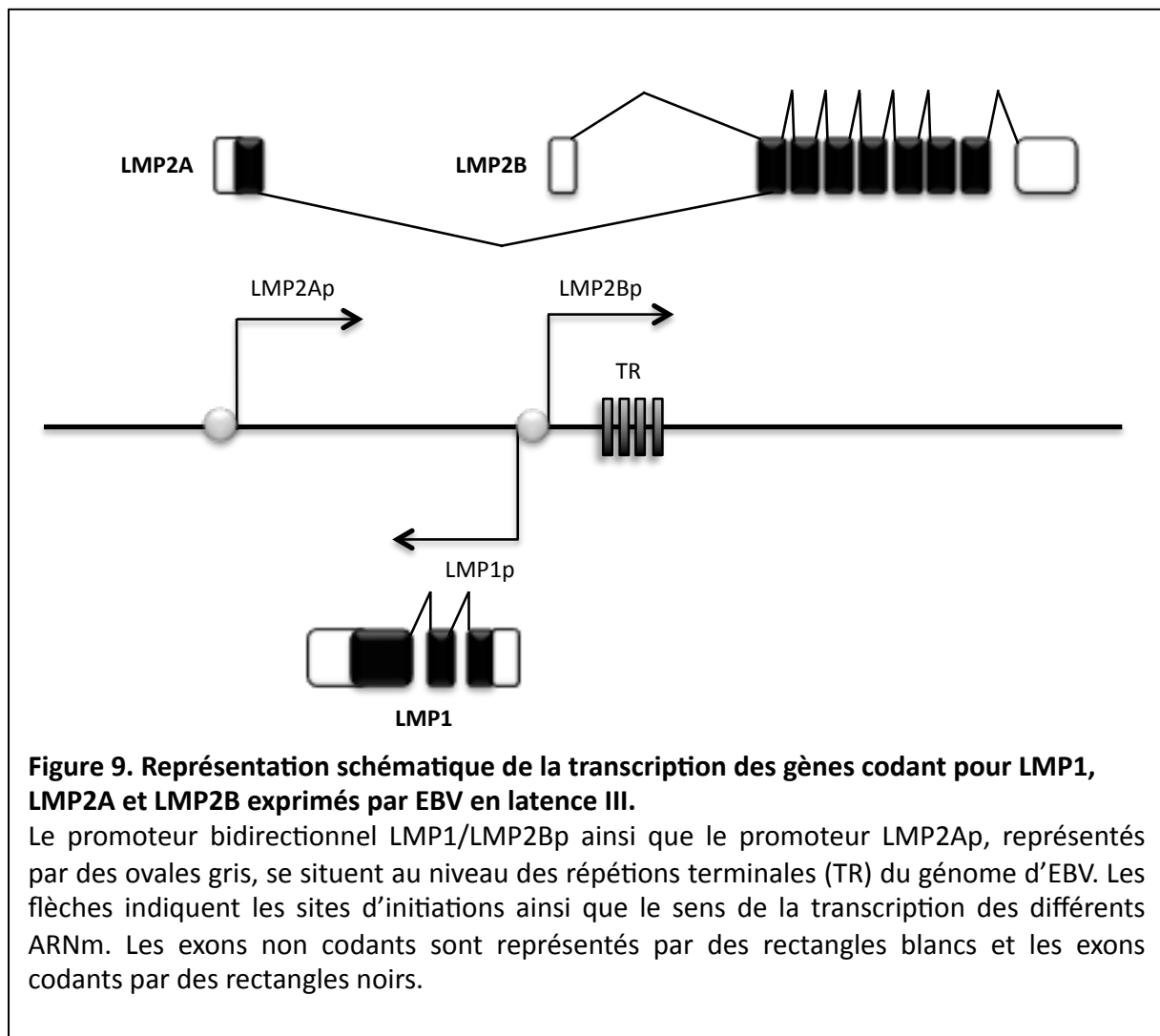
nombreuses protéines cellulaires facilitant la progression entre les différentes phases du cycle cellulaire.

Les protéines EBNA3 ainsi que les différentes fonctions qui leur sont associées seront détaillées dans l'introduction de la partie I de ma thèse.

III. 1. 1. 2. Les protéines membranaires

III. 1. 1. 2. 1. La transcription des LMP

Les transcrits codant pour les protéines membranaires du virus d'Epstein-Barr sont initiés à partir de deux promoteurs spécifiques (Fennewald et al., 1984; Laux et al., 1988) activés par la protéine nucléaire EBNA2 (Zimber-Strobl et al., 1991; Laux et al., 1994b) (**Fig 9**).



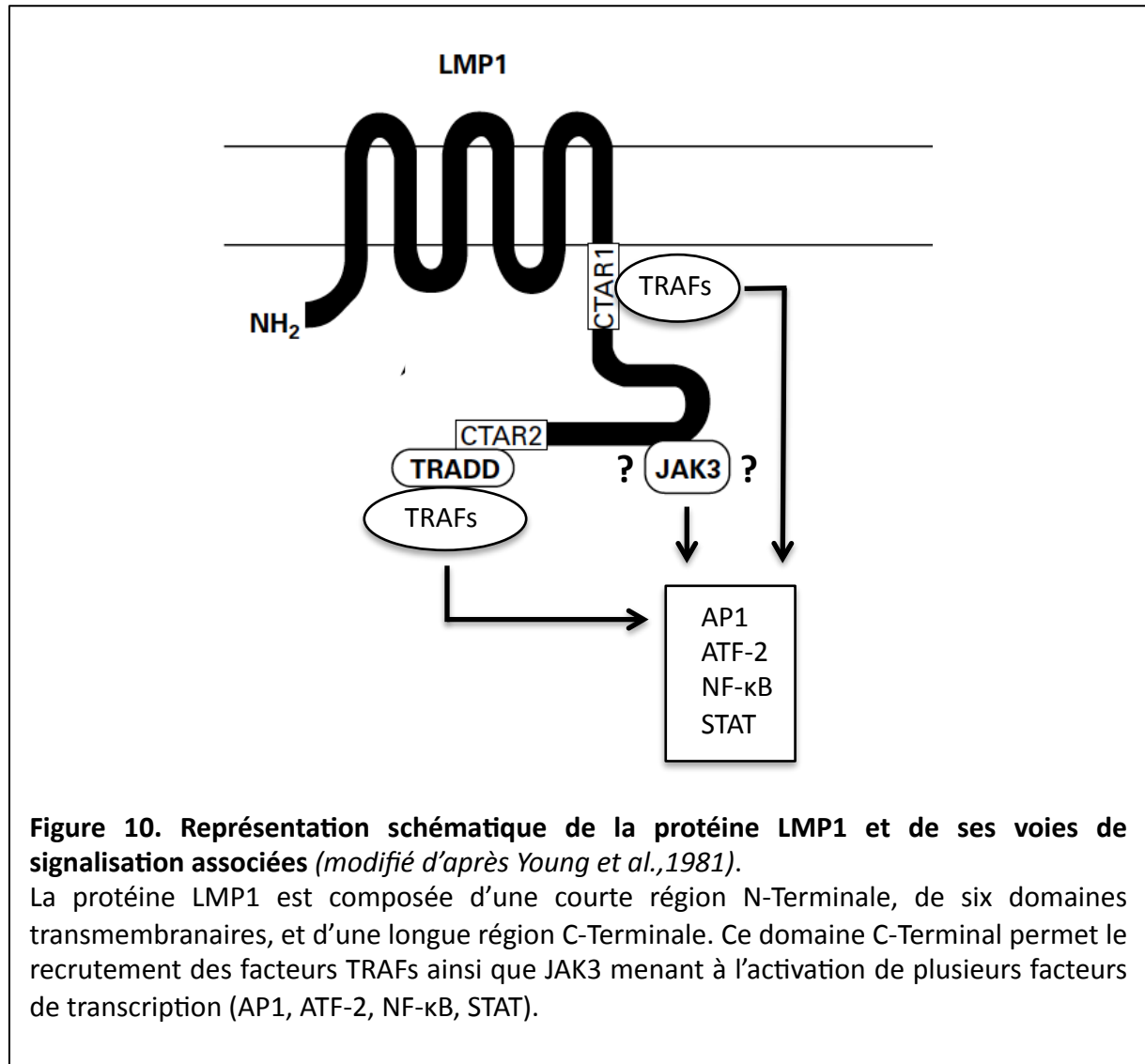
Le transcrit codant la protéine LMP1 est formé de trois exons et est synthétisé vers la gauche, contrairement à tous les autres transcrits exprimés durant la phase de latence. Ce transcrit est initié à partir du promoteur bidirectionnel LMP1/LMP2Bp. Les transcrits codant pour les protéines LMP2A et LMP2B, encore appelées TP1 et TP2, sont formés de multiples exons situés de part et d'autre des TR. Ainsi leur synthèse ne peut être initiée qu'après la circularisation du génome (Laux et al., 1988). Le transcrit codant pour LMP2B est initié à partir du promoteur bidirectionnel permettant aussi de transcrire l'ARNm codant pour LMP1 (Laux et al., 1989) alors que le transcrit codant pour LMP2A est initié par le promoteur LMP2Ap.

III. 1. 1. 2. 2. La protéine LMP1

La protéine LMP1 est codée par l'ORF BNLF1. Cette protéine membranaire est composée de six domaines transmembranaires hydrophobes de 20 acides aminés chacun, structurés en hélice alpha et reliés entre eux par des boucles de 8 à 10 acides aminés (Fennewald et al., 1984; Hennessy et al., 1984). Ces domaines transmembranaires sont entourés d'un court domaine N-Terminal de 23 acides aminés et d'une longue région C-Terminale de 210 acides aminés tous deux intra-cytoplasmiques (**Fig 10**). La protéine LMP1 est distribuée à la surface de la cellule sous forme d'agrégats et est associée à une protéine du cytosquelette, la vimentine (Liebowitz et al., 1986, 1987).

LMP1 est une protéine essentielle à l'immortalisation des cellules B *in vitro* par EBV. En effet, l'utilisation d'un virus recombinant dépourvu du gène codant pour la protéine LMP1 ne permet plus cette immortalisation (Kaye et al., 1993). La protéine LMP1 a aussi des propriétés oncogéniques (Wang et al., 1985; Baichwal and Sugden, 1988; Moorthy and Thorley-Lawson, 1993). En effet, l'expression de LMP1 dans des fibroblastes de rongeurs induit une altération de la morphologie cellulaire, une croissance des cellules en bas sérum et inhibe l'arrêt de la croissance par contact cellules-cellules. De plus, les cellules exprimant LMP1 sont capables de former des tumeurs après injection dans des souris « nude » (Wang et al., 1985). Dans les lymphocytes B, l'expression de LMP1 est responsable d'un nombre important de changements phénotypiques observés après l'infection de cellules B par EBV : agrégation des lymphocytes B, augmentation de l'expression des marqueurs d'activation de cellules B (CD23, CD39, CD40 et CD44), des molécules d'adhésion (ICAM-1, LFA-1 et LFA-3), des molécules du CMH classe II, de la vimentine, du récepteur de la transferrine ainsi que de l'interleukine de type 10 (Wang et al., 1988b, 1990a; Birkenbach et al., 1989;

Nakagomi et al., 1994). De plus, la protéine LMP1 joue un rôle dans la protection des cellules contre la mort par apoptose en induisant l'expression du gène anti-apoptotique *Bcl2* (Henderson et al., 1991; Rowe et al., 1994) et *A20* (Laherty et al., 1992; Fries et al., 1996).

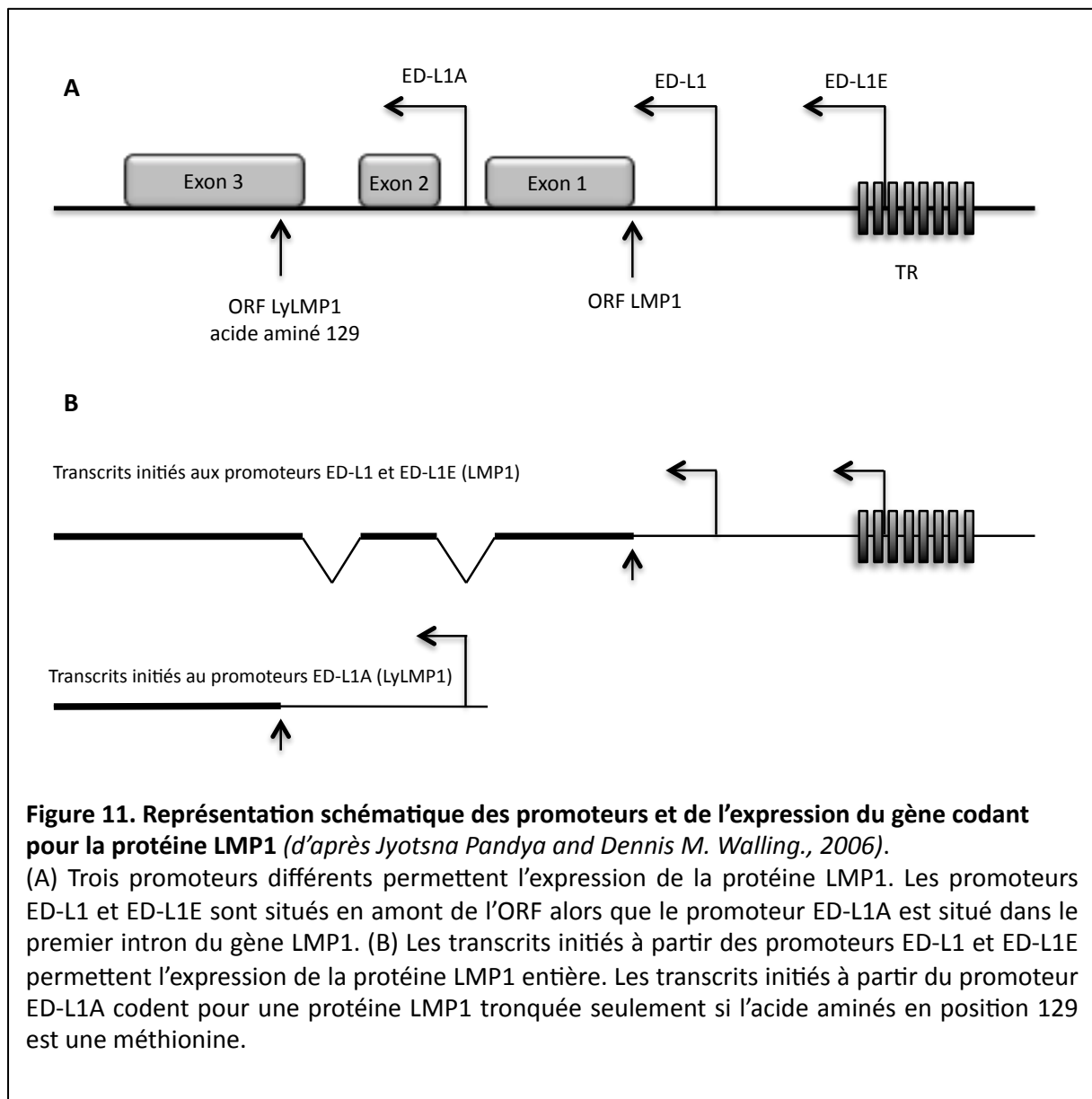


La protéine LMP1 fonctionne comme un récepteur membranaire ligand indépendant (constitutivement actif) et est connue pour être un homologue fonctionnel du récepteur CD40, récepteur faisant parti de la famille du facteur de nécrose tumoral (TNF), essentiel à la croissance et la survie des lymphocytes B. Il a notamment été montré que la protéine LMP1 est capable de substituer partiellement le CD40 chez des souris transgéniques dépourvues de ce récepteur (Uchida et al., 1999). La région C-Terminale de LMP1 recrute par ses domaines CTAR (C-Terminal Activating Region), tout comme CD40, des facteurs associés au récepteur du TNF (TRAFs) et est responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisation

cellulaires permettant l'activation des facteurs de transcription AP-1, ATF-2, et NF- κ B (Kieser et al., 1999; Raab-Traub, 2002; Tsao et al., 2002; Shair et al., 2007; Morris et al., 2009). De plus et bien que ces résultats soient très discutés, il semble que LMP1 soit capable d'activer le facteur de transcription STAT par son interaction avec la protéine Janus kinase 3, JAK3 (Gires et al., 1999; Higuchi et al., 2002; Tsao et al., 2002; Shair et al., 2007). (**Fig 10**). L'activation de ces différentes voies cellulaires est responsable de toutes les conséquences phénotypiques dues à l'expression de LMP1. L'activation de la voie NF- κ B notamment est requise pour la transformation de cellules B par EBV et son inhibition conduit à la mort cellulaire par apoptose (Asso-Bonnet et al., 1998; Cahir-McFarland et al., 2000; Feuillard et al., 2000). Enfin, il a aussi été montré que la protéine LMP1 inhibe l'activation du cycle productif d'EBV via le facteur de transcription NF- κ B (Adler et al., 2002; Prince et al., 2003).

La protéine LMP1 peut être produite à partir de trois transcrits initiés à trois promoteurs différents (**Fig 11A**). Le premier promoteur, ED-L1 (EcoRI D fragment-located LMP1 promoter) aussi appelé LMP1/LMP2Bp, est le promoteur bidirectionnel permettant l'expression des protéines LMP1 et LMP2B. Le deuxième promoteur, ED-L1E ou TR-L1 (Terminal Repeat-located LMP1 promoter), est situé dans les premières répétitions terminales (TR) du génome viral (Sadler and Raab-Traub, 1995b). Les transcrits initiés par ces deux promoteurs, 2,8 kb pour ED-L1 et 3,5 kb pour ED-L1E, permettent l'expression de la protéine LMP1 complète (**Fig 11B**). Enfin un troisième promoteur, ED-L1A, situé à l'intérieur du premier exon du gène LMP1, permet l'expression d'une forme tronquée de la protéine LMP1 (Hudson et al., 1985; Torii et al., 1998; Erickson et al., 2003) (**Fig 11B**). La présence ou l'absence d'expression de la forme tronquée de LMP1 dans les différentes souches d'EBV est déterminée par la séquence du gène BNLF1 au niveau du codon 129 où un codon ATG (méthionine) sert d'initiateur pour la traduction de cette forme atypique, alors qu'un ATT (isoleucine) ou ACC (thréonine) ne permet pas la traduction d'un transcrit ED-L1A (Erickson et al., 2003). Cette forme tronquée de la protéine LMP1 a été appelée « Lytique LMP1 » (LyLMP1) car son expression est augmentée après induction du cycle lytique (Baichwal and Sugden, 1987; Erickson and Martin, 1997). Cette ORF LyLMP1 est présente dans 60% des souches d'EBV (Erickson et al., 2003). Cependant, la fonction de cette LyLMP1 est largement inconnue. En effet cette protéine, contrairement à LMP1 complète, n'active aucune voie de signalisation cellulaire et ne permet pas la transformation de cellules. Par contre, elle peut réguler négativement l'activité de LMP1 (Wang et al., 1988a; Erickson and Martin, 2000; Pandya and Walling, 2006). Il a notamment été montré que l'expression de la protéine LyLMP1 réduit significativement la demi-vie de LMP1 de manière dose dépendante dans les cellules épithéliales (Pandya and Walling,

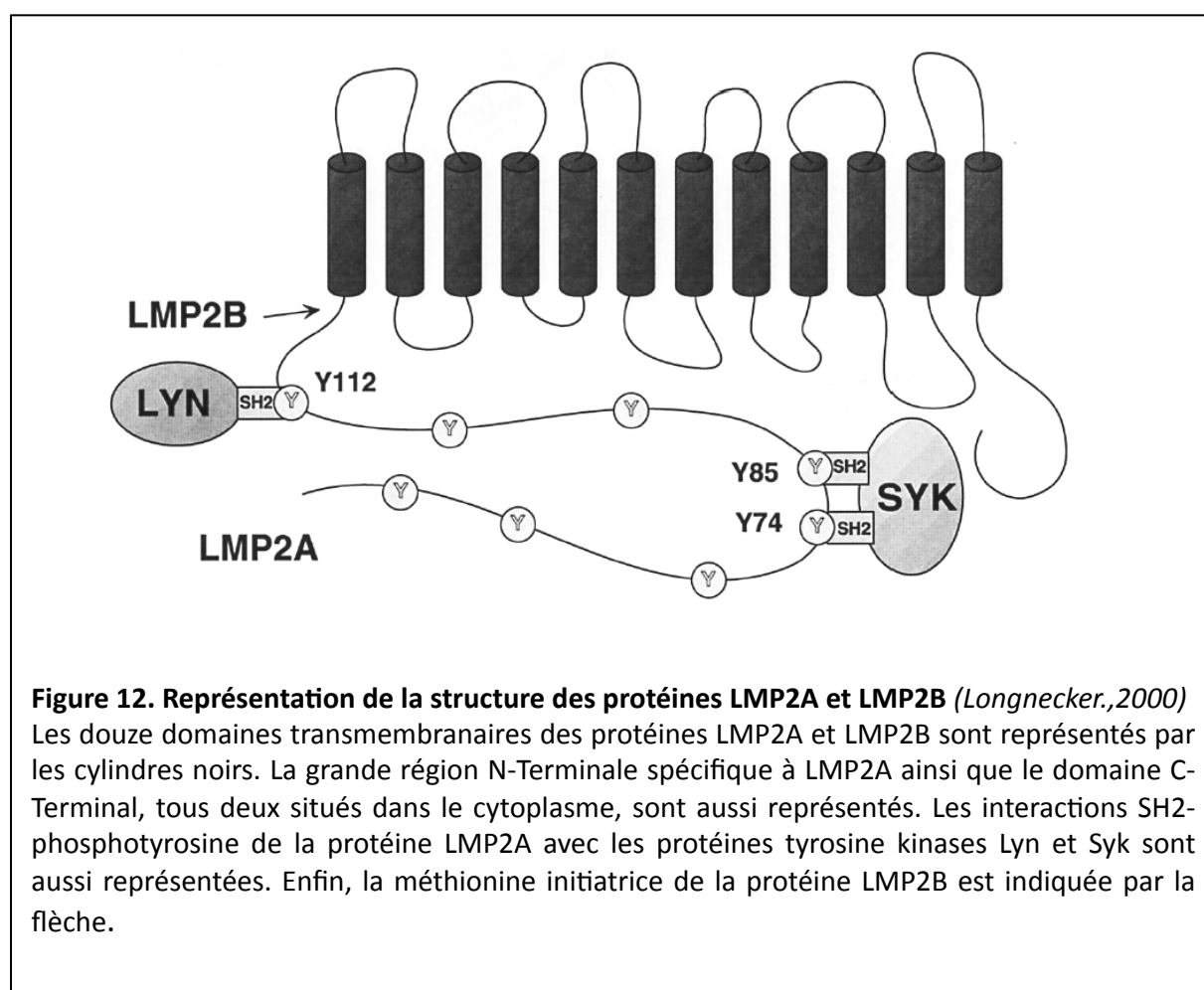
2004). Cependant, le mécanisme par lequel LyLMP1 induit la dégradation de LMP1 n'est pour le moment pas connu.



III. 1. 1. 2. 3. Les protéines LMP2 : LMP2A et LMP2B

Les protéines LMP2A et LMP2B, sont deux protéines transmembranaires. Les transcrits codant pour ces deux protéines sont initiés à partir de deux promoteurs différents et sont constitués chacun de neuf exons, un exon spécifique et huit exons communs. Le premier exon de LMP2A est codant et contient un initiateur de la traduction, contrairement au premier exon de LMP2B qui n'est pas codant et dont l'initiation de la traduction a lieu à partir d'une méthionine interne située au début de l'exon 2, exon commun aux deux transcrits (**Fig 9**). La

protéine LMP2B est donc une forme tronquée de la protéine LMP2A à laquelle il manque les 119 premiers acides aminés. Ainsi la protéine LMP2A présente un domaine N-Terminal cytoplasmique qui est absent de la protéine LMP2B. Outre cette région N-Terminale spécifique à LMP2A, les protéines LMP2 possèdent douze domaines transmembranaires et une queue C-Terminale de 27 acides aminés (**Fig 12**). Les protéines LMP2A et LMP2B sont distribuées à la surface des cellules B infectées par EBV sous forme d'agrégats et la protéine LMP2A est retrouvée colocalisée avec LMP1 dans la membrane plasmique (Longnecker and Kieff, 1990; Longnecker et al., 1991). De plus, il a été montré par des expériences de co-immunoprécipitation que LMP2A et LMP1 interagissent (Longnecker et al., 1991).



L'utilisation de virus recombinants a montré que les protéines LMP2A et LMP2B ne sont pas indispensables à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Longnecker et al., 1992, 1993a, 1993b; Kim and Yates, 1993; Speck et al., 1999). Cependant, l'expression de l'une ou l'autre de ces deux protéines dans des cellules épithéliales augmente leur motilité (Allen et al., 2005).

La région N-Terminale de LMP2A contient huit résidus tyrosines dont deux, Y74 et Y85, forment des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activator Motif) (Fruehling and Longnecker, 1997; Longnecker, 2000). Lorsqu'ils sont phosphorylés, les motifs ITAM présents dans le récepteur des cellules B (BCR) jouent un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes B. Ce rôle essentiel passe par le recrutement et l'activation de protéines tyrosine kinases de la famille src (PTK pour Protéine Tyrosine Kinase) et de la PTK Syk (Cambier et al., 1994). La protéine LMP2A est capable de recruter et de séquestrer ces protéines tyrosine kinases grâce à ses motifs ITAM et cette association régule négativement l'activité de ces protéines (Longnecker et al., 1991; Burkhardt et al., 1992; Fruehling and Longnecker, 1997; Longnecker, 2000). Il a de plus été montré qu'un troisième résidu tyrosine est important pour le recrutement des PTK, le résidu Y112 (Fruehling et al., 1998). LMP2A est aussi capable de recruter des protéines E3 ubiquitine ligase qui vont ubiquitiner les protéines tyrosine kinases et activer leur dégradation par le protéasome (Ikeda et al., 2000). LMP2A est donc capable de moduler les voies de signalisation induites par le BCR. Ainsi, en bloquant la signalisation du BCR, LMP2A inhibe le passage de la latence virale au cycle productif normalement induit par l'activation du BCR (Miller et al., 1994a, 1994b). De plus, en absence d'activation du BCR, LMP2A est capable au contraire d'activer le cycle viral productif (Schaadt et al., 2005). Enfin, la protéine LMP2A permet d'inhiber l'apoptose induite par le BCR en inhibant l'activation des protéines tyrosine kinases induites après l'activation du BCR (Fukuda and Longnecker, 2005).

Bien que LMP2A ne soit pas essentielle, *in vitro*, à l'immortalisation des lymphocytes B, LMP2A, connue pour être un récepteur ligand indépendant, semble jouer un rôle important dans la survie des cellules infectées par EBV *in vivo*. En effet, l'expression de la protéine LMP2A dans des cellules B de souris transgéniques provoque une altération du développement normal des lymphocytes B, altération qui résulte en un blocage des réarrangements des gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines et donc en une absence de BCR. Une cellule B sans BCR à sa surface meurt très vite par apoptose. Cependant, les cellules B sans BCR exprimant la protéine LMP2A se développent et survivent. Ces résultats indiquent que la protéine LMP2A est capable de fournir les signaux de survie nécessaires à la cellule (Caldwell et al., 1998), signaux normalement fournis par le BCR.

La protéine LMP2B, comme LMP2A, permet l'augmentation de la motilité des cellules épithéliales, cependant peu de choses sont connues sur sa fonction dans les cellules B. LMP2B co-localise avec LMP2A au niveau de la membrane cellulaire où les domaines C-Terminaux des deux protéines peuvent interagir (Lynch et al., 2002; Rechsteiner et al., 2007b). Récemment il a été montré que LMP2B régule négativement l'effet de LMP2A sur le maintien de la latence virale (Rechsteiner et al., 2007a, 2007b; Rovedo and Longnecker, 2007). En effet, alors que la sur-expression de LMP2B dans des cellules B infectées par EBV permet une meilleure activation du cycle productif après activation du BCR (Rechsteiner et al., 2007b; Rovedo and Longnecker, 2007), l'inhibition de l'expression de LMP2B par shARN sur ces même cellules réduit la capacité des cellules à entrer en cycle productif après l'activation du BCR (Rechsteiner et al., 2007b). Puisque LMP2A mime l'activation du BCR et peut activer le cycle productif (Schaadt et al., 2005), il a été suggéré que LMP2B peut bloquer cette activation du cycle productif, assurant ainsi le maintien en latence (Rechsteiner et al., 2007b).

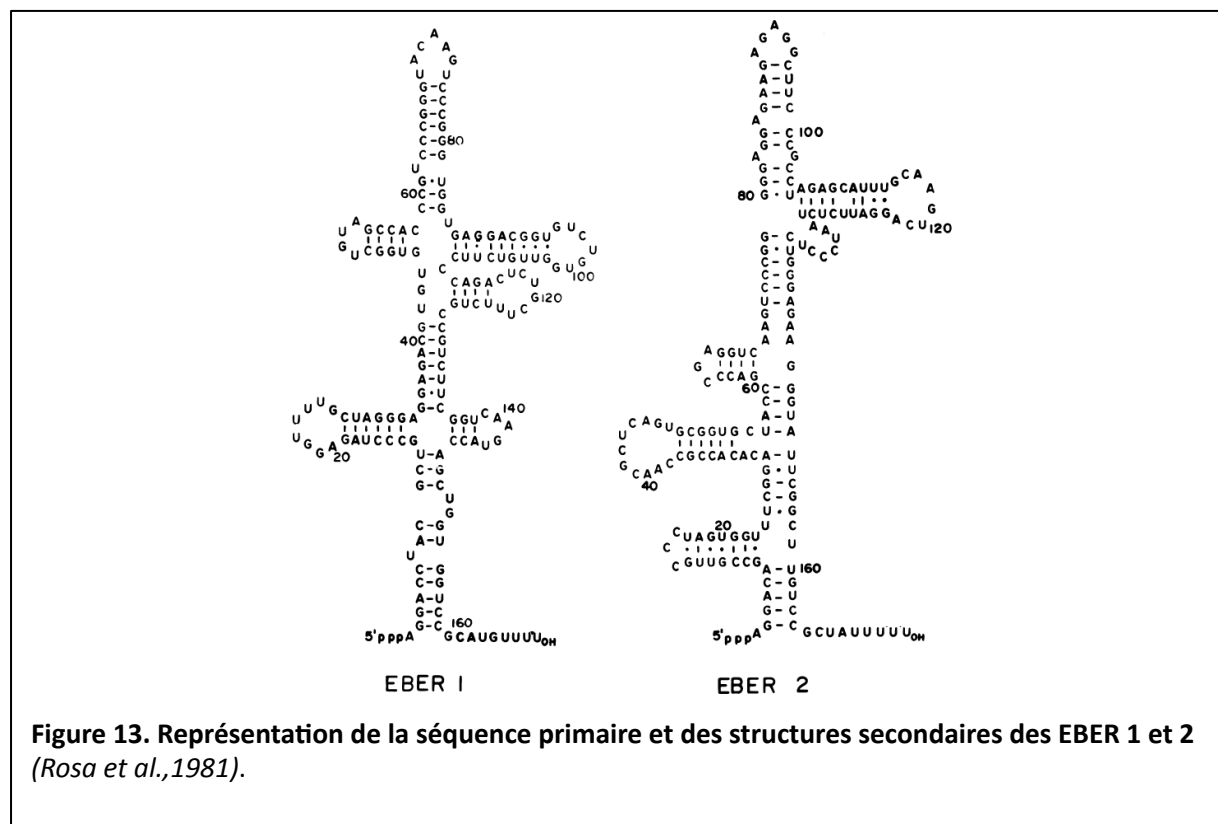
III. 1. 1. 3. Les ARN viraux non codants

III. 1. 1. 3. 1. EBER 1 et EBER 2

Les EBER-1 et -2 sont deux petits ARN de respectivement 167 et 172 nucléotides, non polyadénylés et non codants (Rosa et al., 1981; Glickman et al., 1988) (**Fig 13**). Ces deux ARN sont synthétisés par l'ARN polymérase III au niveau de la région BamHI-C du génome viral en amont de l'*oriP* (Arrand and Rymo, 1982). Ils représentent avec environ 10^7 copies par cellule les transcrits viraux les plus abondants dans des cellules infectées par EBV (Rymo, 1979; Alfieri et al., 1991). Il a récemment été montré que la protéine virale EBNA1 est capable d'augmenter la transcription des ARN EBER en induisant l'expression des facteurs de transcription associés à leur l'expression (Owen et al., 2010). Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que les ARN EBER sont localisés dans le noyau des cellules infectées par EBV (Howe and Shu, 1988). Une délétion de la région exprimant les EBER du génome viral ne perturbe ni l'immortalisation des cellules B *in vitro* par EBV, ni la réplication virale (Swaminathan et al., 1991).

Les ARN EBER en interagissant avec plusieurs protéines cellulaires, dont la protéine PKR (Clarke et al., 1991), la protéine ribosomale L22 (Toczyski and Steitz, 1993), l'antigène associé au Lupus érythémateux La (Lerner et al., 1981), forment des complexes

ribonucléiques très stables. Il a été montré que les EBER confèrent une résistance à l'apoptose induite par l'interféron α (IFN- α) en interagissant avec la PKR et en inhibant sa phosphorylation (Yamamoto et al., 2000; Nanbo et al., 2005). De plus, les EBER induisent l'expression de plusieurs cytokines cellulaires dont l'interleukine 10 (IL-10) dans les cellules B (Kitagawa et al., 2000), l'IL-9 dans les cellules T (Yang et al., 2004) et l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) dans les cellules épithéliales (Iwakiri et al., 2003), chacune fonctionnant comme un facteur de croissance autocrine. Cependant, les mécanismes par lesquels les EBER induisent ces cytokines restent encore à être élucidés.



Enfin, la réintroduction des EBER dans des lignées de lymphome de Burkitt EBV négative restaure leurs capacités à pousser sous agar mou, à induire des tumeurs dans des souris SCID, à résister à l'induction de l'apoptose et à sur-exprimer l'oncoprotéine BCL2 (Komano et al., 1999). Toutes ces études suggèrent que les ARN EBER bien que non essentiels pour l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* par EBV, pourraient avoir une contribution importante dans les pathologies associées à EBV *in vivo*.

III. 1. 1. 3. 2. Les ARN BART et les microARN viraux

Les ARN BART (Rightward Transcripts of the BamH1 A region) ont été identifiés pour la première fois dans des tissus de carcinome du nasopharynx (Hitt et al., 1989) et sont retrouvés dans toutes les latences virales d'EBV (Brooks et al., 1993). Un virus possédant un génome dépourvu de la région BART ne voit pas sa capacité à immortaliser des lymphocytes B *in vitro* altérée indiquant que les ARN BART ne sont pas essentiels (Robertson et al., 1994). Les transcrits provenant de cette région BART sont différenciellement épissés et plusieurs cadres de lecture ouverts (ORF) ont pu être identifiés incluant BARF0, RK-BARF0, A73 et RPMS (Karran et al., 1992; Sadler and Raab-Traub, 1995a; Smith et al., 2000a), mais la question de la production de protéines à partir de ces différentes ORF *in vivo* est très controversée (Van Beek et al., 2003). Cependant, des études réalisées *in vitro* suggèrent différents rôles pour ces protéines. Il a notamment été montré que la protéine RPMS1 serait impliquée dans la régulation négative de la voie Notch et EBNA2 (Smith et al., 2000a).

Cette région BART du génome viral est aussi le lieu d'expression de la grande partie des microARN retrouvés chez EBV. Les microARN (miARN) sont des petits ARN non codants d'environ 21-24 nucléotides de longueur qui jouent un rôle dans l'inhibition post-transcriptionnelle d'ARNm cibles (Bartel, 2004). Le virus d'Epstein-Barr a été le premier virus humain pour lequel des miARN ont été identifiés (Pfeffer et al., 2004). Les miARN d'EBV sont localisés dans deux clusters différents sur le génome d'EBV, un au niveau de la région BART et un au niveau du gène BHRF1 (codant pour une protéine homologue de BCL2) (Grundhoff et al., 1999; Pfeffer et al., 2004; Cai et al., 2006). Les miARN de la région BART sont produits à partir des introns des transcrits BART, excepté le miARN-BART2 qui est transcrit à partir du brins antisens de la région 3'UTR du gène BALF5 (codant pour l'ADN polymérase virale) (Pfeffer et al., 2004). Ces deux clusters de microARN sont différemment exprimés en fonction de la latence virale. En effet, les miARN-BART sont fortement exprimés dans les cellules en latence II (par exemple dans des cellules provenant de cancer du nasopharynx), alors qu'ils sont à peine détectables dans les LCL (latence III) et la plupart des BL (latence I) (Cai et al., 2006). A l'inverse, les miARN BHRF1 sont associés à la latence III et à l'utilisation du promoteur Cp/Wp (Cai et al., 2006). Ceci suggère que les miARN BHRF1 sont issus d'un intron provenant du large transcrit codant les EBNA (Cai et al., 2006; Cullen, 2006).

Le rôle exact de tous les miARN d'EBV reste à élucider, même si certaines études montrent que certains de ces miARN auraient un rôle régulateur de l'immortalisation par EBV (Pfeffer et al., 2004; Lo et al., 2007; Feederle et al., 2011a). Il a notamment été montré que le cluster de miARN BHRF1 contribue à la transformation de cellules B par EBV *in vitro* (Feederle et al., 2011a). En effet, l'utilisation d'un virus mutant dépourvu de ce cluster de miARN montre une capacité de transformation réduite par rapport à un virus sauvage (Seto et al., 2010; Feederle et al., 2011b). Ces miARN BHRF1 permettent d'inhiber l'apoptose et de favoriser la progression du cycle cellulaire dans les phases précoces de l'infection par EBV (Seto et al., 2010). Il a de plus été montré que le microARN-BART2 réprime l'expression de l'ADN polymérase virale BALF5 en entraînant la dégradation de l'ARN messager codant pour BALF5 (Pfeffer et al., 2004; Barth et al., 2007) et que le microARN-BART5 réprime l'expression de la protéine PUMA (protéine pro-apoptotique) (Choy et al., 2008). Enfin, certains miARN BART permettent de réguler négativement l'expression de la protéine de latence LMP1 (Lo et al., 2007), protéine essentielle à l'immortalisation mais pouvant devenir toxique pour les cellules si elle est sur-exprimée (Liu et al., 2002).

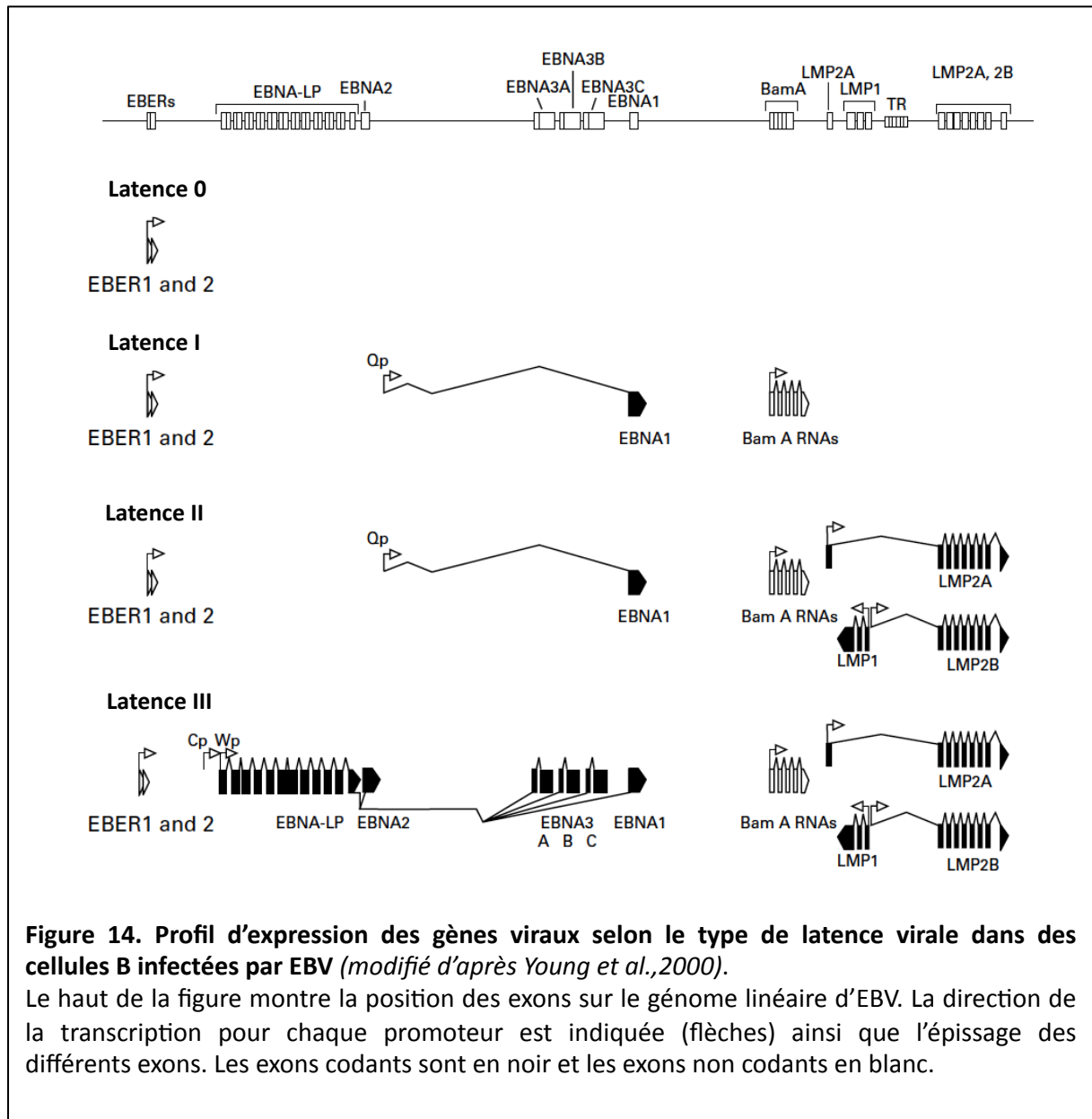
III. 1. 2. Les différentes formes de latence d'EBV

On distingue quatre formes différentes de latence en fonction des différents produits viraux exprimés : la latence de type 0, I, II ou III (**Fig 14**).

Le modèle standard de latence est celui retrouvé *in vitro* dans les LCL. Ce type de latence, appelé latence de type III, est caractérisé par l'expression de l'ensemble des six protéines nucléaires (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP), des trois protéines membranaires (LMP1, -2A et -2B), des deux petits ARN messagers non-polyadénylés (EBER 1 et 2), des ARN BART, ainsi que des microARN. Le programme d'expression des gènes viraux de latence III est retrouvé dans certains lymphomes survenant chez les personnes immunodéprimées (post-transplantés ou patients au stade SIDA de l'infection par le VIH) (Young et al., 1989).

La latence II est caractérisée par l'expression des protéines virales EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B, ainsi que les EBER, les BART et certains miARN. Dans ces cellules, la protéine EBNA1 est initiée au promoteur Qp. Ce profil d'expression est retrouvé dans les carcinomes du nasopharynx (NPC) et les lymphomes de Hodgkin (Fåhræus et al., 1988,

1988; Young et al., 1988; Brooks et al., 1992; Busson et al., 1992; Deacon et al., 1993), ainsi que dans les lymphomes T associés à EBV (Chen et al., 1993). Dans les carcinomes du nasopharynx, c'est le deuxième promoteur de LMP1 (ED-L1E) localisé à l'intérieur des régions TR qui permet l'expression de la protéine LMP1 (Gilligan et al., 1990; Sadler and Raab-Traub, 1995b). Il a notamment été montré que ce promoteur est positivement régulé par la famille des facteurs de transcription STAT (Chen et al., 2001).



La latence de type I est caractérisée par la répression des promoteurs Cp, Wp et des promoteurs codant les LMP et par l'expression de la protéine EBNA1, initiée au promoteur Qp (Sample et al., 1991; Schaefer et al., 1995a). On retrouve aussi associé à cette latence les

ARN EBER, BART et les miARN. Ce profil d'expression est associé *in vivo* aux cellules du lymphome de Burkitt (Rowe et al., 1987) ainsi qu'aux cellules B mémoires en division (Hochberg et al., 2004).

Un dernier type de latence a été décrit, la latence de type 0, latence associée aux lymphocytes B mémoires au repos infectés par EBV *in vivo*, dans lesquels aucune protéine virale n'est exprimée. Seuls les ARN EBER et BART ainsi que les transcrits codant pour LMP2A sont transcrits sans production détectable de la protéine virale (Qu and Rowe, 1992; Miyashita et al., 1997; Babcock et al., 1998, 1999, 2000). Cependant, certains auteurs remettent en cause l'expression d'ARNm LMP2A dans les cellules B mémoires au repos (Hochberg et al., 2004). Dans tous les cas, le virus peut ainsi persister durant toute la vie de l'individu infecté caché du système immunitaire (Babcock et al., 1998).

Enfin, il est intéressant de savoir qu'un cinquième type de latence, retrouvé dans 20% des lymphomes de Burkitt endémiques a récemment été décrit. Ce type de latence est appelé « latence Wp stricte » et exprime en plus de la protéine EBNA1 les trois protéines EBNA3 ainsi qu'une forme tronquée de la protéine EBNA-LP (Kelly et al., 2002). Le génome viral associé à cette latence est dépourvu du gène codant pour EBNA2 et les différentes protéines EBNA exprimées sont traduites à partir d'un transcrit primaire provenant du promoteur Wp. Plus récemment, l'étude de cette forme de latence a permis de mettre en évidence qu'un gène viral associé au cycle lytique, le gène BHRF1 (un homologue de l'anti-apoptotique BCL2) (Pearson et al., 1987; Henderson et al., 1991), est exprimé en latence Wp stricte (Kelly et al., 2009). L'expression de cette protéine, très faible par rapport aux autres protéines de latence, est aussi retrouvée dans les LCL (latence III), faisant de BHRF1 une nouvelle protéine de latence (Kelly et al., 2009).

III. 2. Réactivation du virus et cycle productif

III. 2. 1. La réactivation

Dans certains cas, la phase de latence du virus d'Epstein-Barr est rompue (phénomène de réactivation) de manière spontanée et permet l'entrée du virus dans le cycle productif. Ces épisodes de réactivation virale surviennent *in vivo* exclusivement dans des lymphocytes B différenciés en plasmocytes. Cependant, les mécanismes exacts impliqués dans cette

réactivation sont encore peu connus. L'étude des mécanismes de réactivation a surtout été menée *in vitro* et la plupart des études ont été effectuées sur des cellules issues de lymphome de Burkitt qui, contrairement aux LCL, se réactivent plus facilement. En effet, il a notamment été montré que les protéines LMP1 et LMP2A, qui ne sont pas exprimées dans les cellules de lymphome de Burkitt, sont capables d'inhiber la réactivation du virus (Adler et al., 2002; Prince et al., 2003; Fukuda and Longnecker, 2005). L'activation du cycle productif résulte de l'activation de certaines voies de signalisation cellulaire. Les agents les plus utilisés pour induire le cycle productif viral d'EBV *in vitro* sont le TPA (12-O-Tétradécanoyl-Phorbol 13-Acétate) associé au BA (Acide Butyrique) (zur Hausen et al., 1978; Luka et al., 1986), mais des agents considérés comme plus physiologiques peuvent également être utilisés, c'est le cas des ionophores calciques (Faggioni et al., 1986), du TGF- β (Fahmi et al., 2000), ou des activateurs de la voie du BCR comme les anti-immunoglobulines de surface (Takada and Ono, 1989). Ces agents induisent tous l'activation des gènes BZLF1 et BRLF1 codant pour deux facteurs de transcription viraux responsables de l'activation du cycle productif d'EBV (Flemington and Speck, 1990a, 1990b, 1990c; Flemington et al., 1991).

III. 2. 2. Le cycle productif

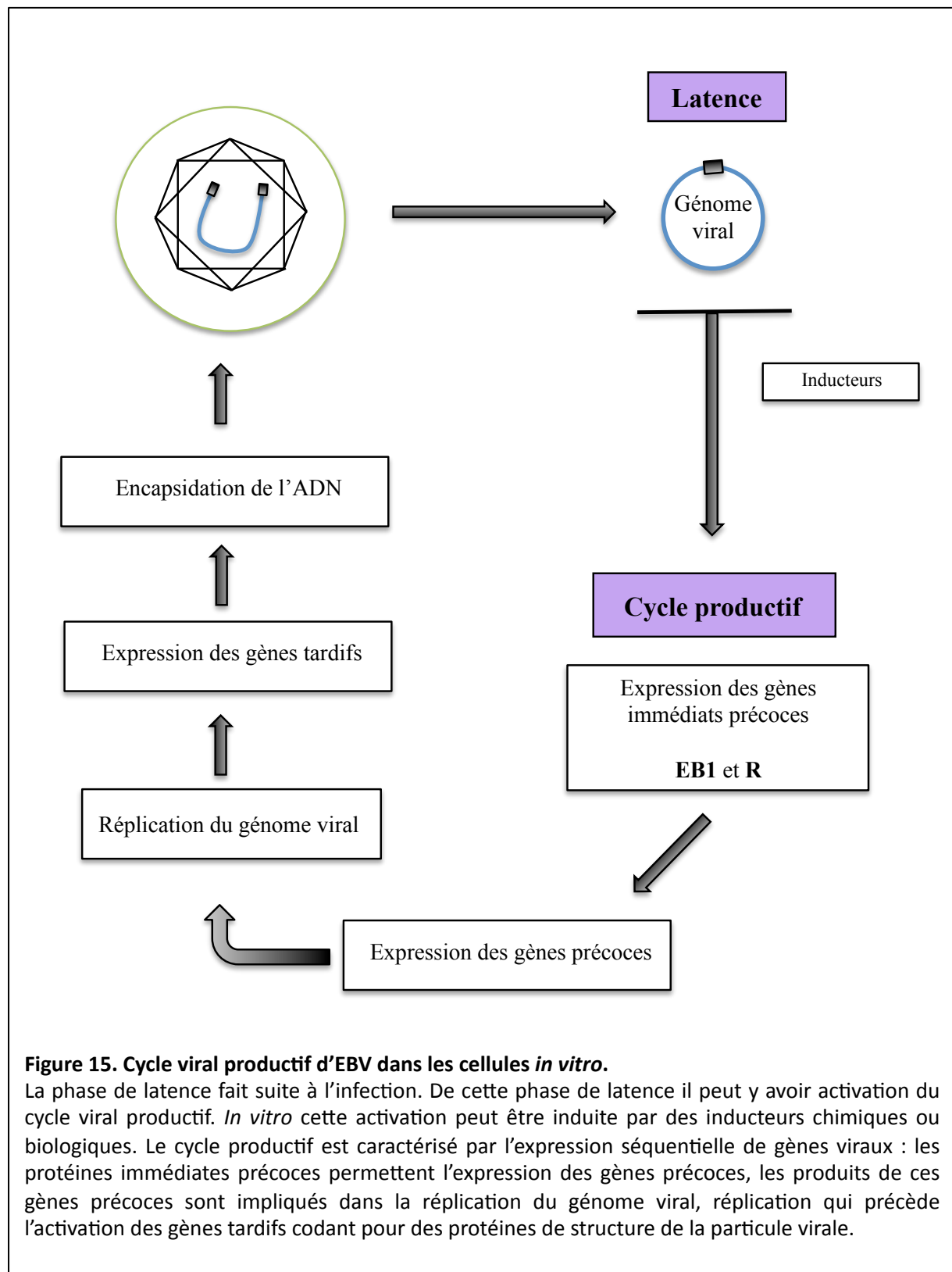
Le cycle productif est caractérisé par la production de particules virales et comporte trois phases, très précoce, précoce et tardive, correspondant à l'expression séquentielle de trois catégories de gènes viraux distincts (**Fig 15**). L'initiation du cycle productif passe par l'activation de différentes voies de signalisation cellulaires activées par les différents agents inducteurs.

III. 2. 2. 1. Les gènes immédiats précoces

Le cycle productif d'EBV débute par l'expression de gènes dits « immédiats précoces », les gènes BZLF1 et BRLF1 codant respectivement pour les facteurs de transcription EB1 (encore appelé Zebra ou Zta) et R (encore appelé Rta).

EB1 est la première protéine virale à être exprimée. Elle détermine l'entrée du virus dans la phase productive en coopération avec la protéine R. EB1 est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines « b-zip » (pour « basic leucine zipper ») qui se fixe sous forme d'hétérodimère à l'ADN (Lieberman and Berk, 1990). Il a notamment été montré que la seule expression de la protéine EB1 dans des cellules infectées par EBV est

nécessaire et suffisante à l'induction du cycle productif (Countryman and Miller, 1985; Chevallier-Greco et al., 1986; Manet et al., 2003).



Ce facteur de transcription viral joue un rôle dans l'activation du cycle productif en activant son propre promoteur, le promoteur du gène BRLF1 et ceux des gènes précoces (Buisson et al., 1989; Chavrier et al., 1989; Rooney et al., 1989; Urier et al., 1989; Gruffat et al., 1990; Sinclair et al., 1991). De plus, il a été montré qu'EB1 est capable d'inhiber les promoteurs Cp, Wp et LMP1/LMP2Bp, promoteurs utilisés en latence (Kenney et al., 1989).

La protéine R codée par le gène BRLF1 (Hardwick et al., 1988) est un facteur de transcription qui agit sous forme de dimère en se fixant à l'ADN au niveau de nombreux promoteurs de gènes précoces (Buisson et al., 1989; Gruffat et al., 1990, 1992; Manet et al., 1991; Gruffat and Sergeant, 1994). R et EB1 agissent au niveau de certains promoteurs précoces de manière synergique (Cox et al., 1990; Giot et al., 1991). Enfin, il a été rapporté que la protéine R seule est capable d'activer le cycle lytique dans des cellules épithéliales (Zalani et al., 1996) et dans certaines cellules B mais de manière moins efficace que la protéine EB1 (Westphal et al., 1999).

III. 2. 2. 2. Les gènes précoces

Les gènes précoces sont définis comme les gènes viraux exprimés après réactivation mais avant la réplication du génome viral. Le génome viral est répliqué probablement suivant le mécanisme du cercle roulant via deux origines de réplication *ori-Lyt*. La réplication de ce génome met en jeu un complexe de réplication d'origine virale composé d'une ADN polymérase (BALF5) et de son facteur de processivité (BMRF1), d'une hélicase (BBLF4), d'une protéine de liaison à l'ADN simple brin (BALF2), d'une primase (BSLF1) et de son facteur associé (BBLF2/3) et nécessite aussi la présence du facteur immédiat précoce EB1 (Fixman et al., 1992).

Les gènes définis comme précoces codent essentiellement des protéines ayant un lien avec la réplication du génome viral mais d'autres protéines ont aussi été décrites notamment la protéine EB2, le produit du gène BHRF1 et le produit du gène BcRF1.

EB2, produite à partir de l'ORF BMLF1, est une protéine précoce du cycle productif d'EBV. Cette protéine interagit avec l'ARN et permet l'accumulation cytoplasmique de certains ARN messagers viraux précoces et tardifs produits à partir de gènes dépourvus d'intron (Semmes et al., 1998; Batisse et al., 2005; Juillard et al., 2009, 2012). La protéine EB2 est indispensable à la formation de nouveaux virions (Gruffat et al., 2002), et en son absence certains ARNm viraux précoces et la plupart des tardifs sont inefficacement

exprimés. Enfin, en plus de son action sur la stabilisation et l'export des ARNm viraux, EB2 joue un rôle dans la traduction de ces ARNm (Ricci et al., 2009).

BHRF1 est l'homologue fonctionnel viral du proto-oncogène BCL2 (Pearson et al., 1987; Henderson et al., 1993) et protège les cellules B ainsi que les cellules épithéliales de la mort par apoptose durant le cycle productif (Henderson et al., 1993; Dawson et al., 1998; Huang et al., 1998). Récemment, il a aussi été montré que BHRF1 est exprimé durant la latence virale (Kelly et al., 2009).

La protéine BcRF1 est une protéine précoce du cycle productif d'EBV dont la fonction a récemment été découverte (Gruffat et al., 2012). En effet, BcRF1 est une TBP-like et est indispensable à l'expression des gènes tardifs. La protéine TBP (TATA-box Binding Protein) est la protéine cellulaire responsable de la formation du complexe de pré-initiation de la transcription sur les promoteurs cellulaires possédant une boîte TATA (Pugh and Tjian, 1992; Hampsey, 1998). La protéine BcRF1 est donc capable de se fixer, comme TBP, sur des séquences TATA, ainsi que sur des séquences TATT, séquences spécifiques de la plupart des gènes tardifs (Serio et al., 1998).

III. 2. 2. 3. Les gènes tardifs

La phase tardive est définie par l'expression des gènes tardifs codant essentiellement pour des protéines structurales du virus d'Epstein-Barr (protéines de capsid, protéines du tégument, glycoprotéines d'enveloppe) (Hummel and Kieff, 1982; Johannsen et al., 2004). Les gènes tardifs d'EBV sont traditionnellement définis comme les gènes exprimés après la réplication de l'ADN. C'est pourquoi l'utilisation de l'acyclovir et du ganciclovir, deux analogues nucléotidiques bloquant la réplication de l'ADN viral, inhibe l'expression des gènes tardifs et bloque donc la production de nouvelles particules virale (Datta et al., 1980; Lin et al., 1987; Lin and Machida, 1988). Certains gènes tardifs peuvent cependant être exprimés indépendamment de la réplication de l'ADN (Serio et al., 1997, 1998). Un grand nombre de gènes cellulaires, transcrits par l'ARN polymérase II, présente dans leurs promoteurs une séquence TATA sur laquelle est recrutée la protéine TBP qui permettra la formation du complexe de pré-initiation (Pugh and Tjian, 1992; Hampsey, 1998). Alors que les promoteurs des gènes très précoces et précoces possèdent cette séquence TATA, les promoteurs de la plupart des gènes tardifs possèdent en lieu et place de la boîte TATA une séquence consensus TATT (Serio et al., 1998).

A la fin de la phase tardive les concatémères linéaires d'ADN viral issus de la réplication sont clivés au niveau des régions TR pour former des unités d'ADN viral qui sont ensuite empaquetées dans les virions (Sato et al., 1990). La phase tardive de l'infection aboutit à la production de nouvelles particules virales.

IV. Physiopathologie de l'infection par le virus d'Epstein-Barr

IV. 1. Les différentes étapes de l'infection

IV. 1. 1. Entrée du virus dans ses cellules cibles

Le virus d'Epstein-Barr est associé à un grand nombre de pathologies telles que le Lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin, le carcinome de nasopharynx ainsi que des lymphomes T/NK. EBV est donc capable d'infecter différents types cellulaires : lymphocytes B, cellules épithéliales, cellules T/NK. L'infection commence par l'entrée d'un virus enveloppé dans une cellule ce qui implique au moins deux phénomènes différents : la fixation du virus à sa cellule cible et la pénétration à travers la membrane cellulaire. Cette pénétration implique la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane de la cellule cible et peut se produire à la surface cellulaire ou après endocytose. L'entrée du virus d'Epstein-Barr dans les lymphocytes B et les cellules épithéliales est la mieux décrite et diffère à la fois en terme de protéines (virales et cellulaires) impliquées et de voies de signalisation mises en jeu (Miller and Hutt-Fletcher, 1992).

IV. 1. 1. 1. Entrée du Virus dans les Lymphocytes B

L'infection commence par la fixation du virus à la cellule B. Pour cela l'EBV utilise le récepteur cellulaire CD21 (ou CR2), récepteur appartenant à la famille des immunoglobulines et fixant le fragment C3d du complément (Frade et al., 1985). L'EBV se lie au récepteur CD21 via sa glycoprotéine d'enveloppe gp350/220 permettant ainsi la fixation de la particule virale sur la cellule (Tanner et al., 1987). La glycoprotéine gp350/220 est une protéine virale très abondante et fortement glycosylée. Sa double nomenclature est due au fait que cette protéine possède deux formes issues d'ARNm différemment épissés, une de 350 kDa et une de 220 kDa (Hummel et al., 1984; Beisel et al., 1985). Cette fixation d'EBV à la surface des cellules B par l'intermédiaire du récepteur CD21 stimule l'endocytose du virus (Nemerow

and Cooper, 1984; Tanner et al., 1987). Il a notamment été montré que ce phénomène d'endocytose est nécessaire à l'entrée du virus dans les lymphocytes B (Miller and Hutt-Fletcher, 1992). En effet, le traitement de cellules B avec le chlorpromazine, un inhibiteur de l'endocytose, inhibe l'entrée du virus dans la cellule. La fusion de l'enveloppe du virus avec la cellule B nécessite au moins trois glycoprotéines virales formant un tri-complexe non covalent : la gp85, la gp25 et la gp42. Un virus recombinant n'exprimant plus la protéine gp85 est encore capable de se fixer sur les lymphocytes B, mais ne peut plus les infecter (Molesworth et al., 2000; Oda et al., 2000). La protéine gp42 se lie aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII) déclenchant alors le mécanisme de fusion. La protéine gp42 est donc indispensable à la fusion du virus avec la membrane cellulaire du lymphocyte B (Wang and Hutt-Fletcher, 1998; Haan and Longnecker, 2000).

Le modèle d'entrée du virus dans une cellule B est donc le suivant : la fixation de la particule virale via l'interaction gp350/CD21 stimule l'endocytose du virus, puis, la glycoprotéine gp42 du tri-complexe gp85-gp25-gp42 interagit avec le CMH classe II et cet événement active le mécanisme de fusion (Hutt-Fletcher, 2007).

IV. 1. 1. 2. Entrée du Virus dans les cellules épithéliales

Les mécanismes d'entrée du virus dans les cellules épithéliales sont différents de ceux impliqués pour les lymphocytes B et ne nécessitent pas l'endocytose du virus (Miller and Hutt-Fletcher, 1992).

Le couple ligand/récepteur impliqué dans la fixation du virus aux cellules épithéliales est beaucoup moins clair. Certaines cellules épithéliales expriment faiblement le récepteur CD21 (Imai et al., 1998; Fingerroth et al., 1999). Cette faible quantité de CD21 présente à la surface de ces cellules pourrait être suffisante pour permettre l'adsorption du virus. Cependant, certaines cellules épithéliales dans lesquelles EBV a été détecté *in vivo*, n'expriment pas du tout le récepteur CD21 à leur surface (Yoshiyama et al., 1997), indiquant qu'il existe un mécanisme d'infection indépendant de CD21. Ces cellules épithéliales, CD21 négatives, expriment une molécule encore non identifiée facilitant la fixation du virus via le complexe gp85/gp25 (Molesworth et al., 2000; Oda et al., 2000). En effet, un virus déficient pour ces deux glycoprotéines perd la capacité à se fixer sur ces cellules alors qu'une forme soluble de gp85/gp25 montre une fixation spécifique (Borza et al., 2004).

Au moins trois autres mécanismes de fixation du virus aux cellules épithéliales n'impliquant ni la gp350/220 ni le CD21 ont été proposés : le premier, proposé par Sixbey et ses collaborateurs (Sixbey and Yao, 1992), implique des IgA anti-gp350/220. En effet, les cellules épithéliales portant à leur surface le récepteur aux IgA, peuvent être infectées par un virus recouvert d'IgA anti-gp350/220 ; le deuxième mécanisme fait intervenir les glycoprotéines gp85/gp25. Il a notamment été montré qu'un virus déficient pour l'expression de la gp85 ne peut plus se fixer et donc infecter des cellules épithéliales (Molesworth et al., 2000; Oda et al., 2000). De plus une forme soluble gp85/gp25 produite en baculovirus interagit spécifiquement à la surface des cellules épithéliales et cette interaction est réduite par un anticorps spécifique au complexe gp85/gp25 (Borza et al., 2004). Ces résultats indiquent donc qu'il existe à la surface des cellules épithéliales un récepteur spécifique pour le complexe gp85/gp25. Cependant ce récepteur n'est toujours pas identifié à ce jour ; enfin, un dernier mécanisme d'attachement aux cellules épithéliales implique l'interaction entre la protéine virale BMRF2 et les intégrines cellulaires $\alpha 5 \beta 1$ (Tugizov et al., 2003).

Pour ce qui est de la fusion du virus avec la cellule épithéliale, il a été montré que ce phénomène requiert les glycoprotéines gp85 et gp25 (McShane and Longnecker, 2004), la protéine gp42 n'étant pas essentielle (Wang et al., 1998). En effet, les cellules épithéliales n'expriment pas le CMH de classe II et des virus recombinants sans gp42 infectent aussi bien les cellules épithéliales que des virus sauvages. De plus, il semblerait même que sa présence soit inhibitrice pour l'infection de cellules épithéliales (Wang et al., 1998). Ces cellules doivent donc exprimer un co-récepteur encore inconnu capable de remplacer le CMH classe II et capable d'interagir avec les gp85/gp25 en absence de la gp42.

Le modèle d'entrée du virus dans les cellules épithéliales est donc le suivant : après la fixation du virus à la surface de la cellule épithéliale, l'interaction des glycoprotéines gp85/gp25 avec un co-récepteur active le mécanisme de fusion (Hutt-Fletcher, 2007).

Les mécanismes d'entrée du virus dans les cellules épithéliales restent malgré tout peu compris. De plus, d'autres modes d'infection de cellules épithéliales par le virus d'Epstein-Barr sont décrits dans la littérature. En effet, il a été montré que le contact cellules-cellules entre des cellules B infectées par EBV et des cellules épithéliales permet l'infection *in vitro* de ces dernières (Imai et al., 1998; Chang et al., 1999; Tugizov et al., 2003; Shannon-Lowe et al., 2006). Enfin, et toujours *in vitro*, il a été montré qu'une cellule épithéliale polarisée de

l'oropharynx infectée par EBV est capable de disséminer le virus aux cellules épithéliales voisines à travers sa membrane latérale (Tugizov et al., 2003).

IV. 1. 1. 3. La glycoprotéine gp42, protéine clé du tropisme d'EBV

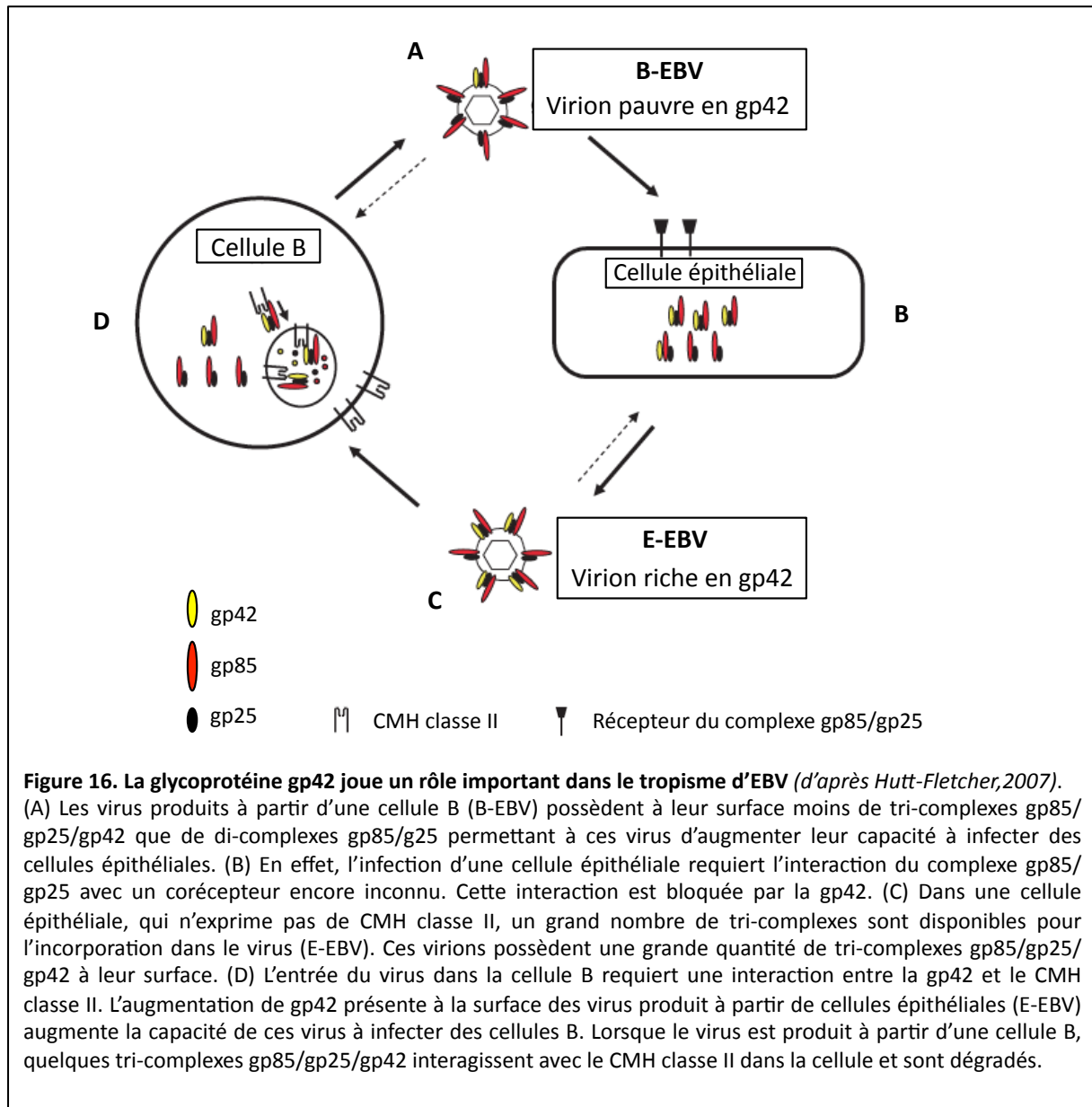
L'observation que la gp42 était indispensable à l'infection de cellules B mais non requise à l'infection de cellules épithéliales suggère que la présence ou non de cette protéine à la surface de la particule virale influence le tropisme d'EBV pour l'un ou l'autre de ces deux types cellulaires (Borza and Hutt-Fletcher, 2002). Il a notamment été montré que des virus produits à partir de cellules épithéliales (donc dépourvues de CMH classe II) sont beaucoup plus infectieux pour des lymphocytes B que la même quantité de virus produits à partir de cellules B. Les deux types de virus sont capables de se fixer de la même façon sur les cellules B par l'intermédiaire du récepteur CD21, mais les virus produits à partir des cellules B rentrent moins efficacement. Ce phénomène s'explique par la quantité de gp42 présente dans l'enveloppe virale. En effet dans des cellules B, il semble qu'au cours de la biosynthèse du virus la glycoprotéine gp42 interagisse avec le CMH classe II et est donc dégradée. Cette dégradation n'a pas lieu dans les cellules épithéliales puisqu'elles n'expriment pas le CMH classe II. En conséquence, les virus produits à partir de cellules B comportent moins de gp42 que ceux produits à partir de cellules épithéliales.

La glycoprotéine gp42 pourrait donc fonctionner comme un facteur de sélection du tropisme du virus d'Epstein-Barr (Borza and Hutt-Fletcher, 2002; Hutt-Fletcher, 2007) (**Fig 16**).

IV. 1. 1. 4. Entrée du virus dans les autres types cellulaires

EBV est capable d'infecter d'autres cellules que les lymphocytes B et les cellules épithéliales comme les lymphocytes T (Watry et al., 1991; Fujiwara and Ono, 1995; Groux et al., 1997), les cellules Natural Killer (NK) (Kawa-Ha et al., 1989; Hart et al., 1992; Kaneko et al., 1995) ainsi que les monocytes (Revoltella et al., 1989; Shimakage et al., 1999; Savard et al., 2000). De nombreuses études décrivent une infection latente de type II dans ces trois types cellulaires (Fujiwara and Ono, 1995; Kanegane et al., 1996; Masy et al., 2002) mais les mécanismes d'entrée du virus sont encore peu connus. Le récepteur cellulaire pour le virus d'Epstein-Barr est le récepteur CD21, récepteur exprimé à la surface des lymphocytes B et des cellules dendritiques folliculaires. Des études ont montré que les lymphocytes T

expriment le récepteur CD21 ou une molécule très proche, permettant ainsi l'infection par l'EBV (Tsoukas and Lambris, 1988; Fischer et al., 1991). Il a de même été montré que les monocytes expriment, très faiblement, le récepteur CD21 ainsi que le CMH de classe II (Masy et al., 2002), connu pour être le co-récepteur de l'infection par EBV.



Le mécanisme d'infection des cellules NK est lui encore moins clair puisque ces cellules expriment le CMH de classe II mais n'expriment pas le récepteur CD21 (Kasahara and Yachie, 2002). Une étude a cependant montré que les cellules NK sont capables de former une synapse immunologique avec les cellules B infectées par EBV et par ce mécanisme, pourraient acquérir par transfert synaptique le récepteur CD21 de manière

transitoire (Tabiasco et al., 2003). Cette acquisition permettrait alors au virus d'entrer et d'infecter les cellules NK.

De manière intéressante, un autre mécanisme d'infection indirect a été décrit. En effet, Holmgren et ses collaborateurs ont montré que des corps apoptotiques dérivés de cellules B infectées par EBV peuvent servir de source pour un transfert du virus vers des cellules dépourvues de récepteur CD21 (Holmgren et al., 1999). Enfin, EBV est capable *in vitro* d'infecter encore d'autres types cellulaires dont des neutrophiles (Larochelle et al., 1998), des cellules dendritiques folliculaires (Lindhout et al., 1994) ainsi que des astrocytes (Menet et al., 1999).

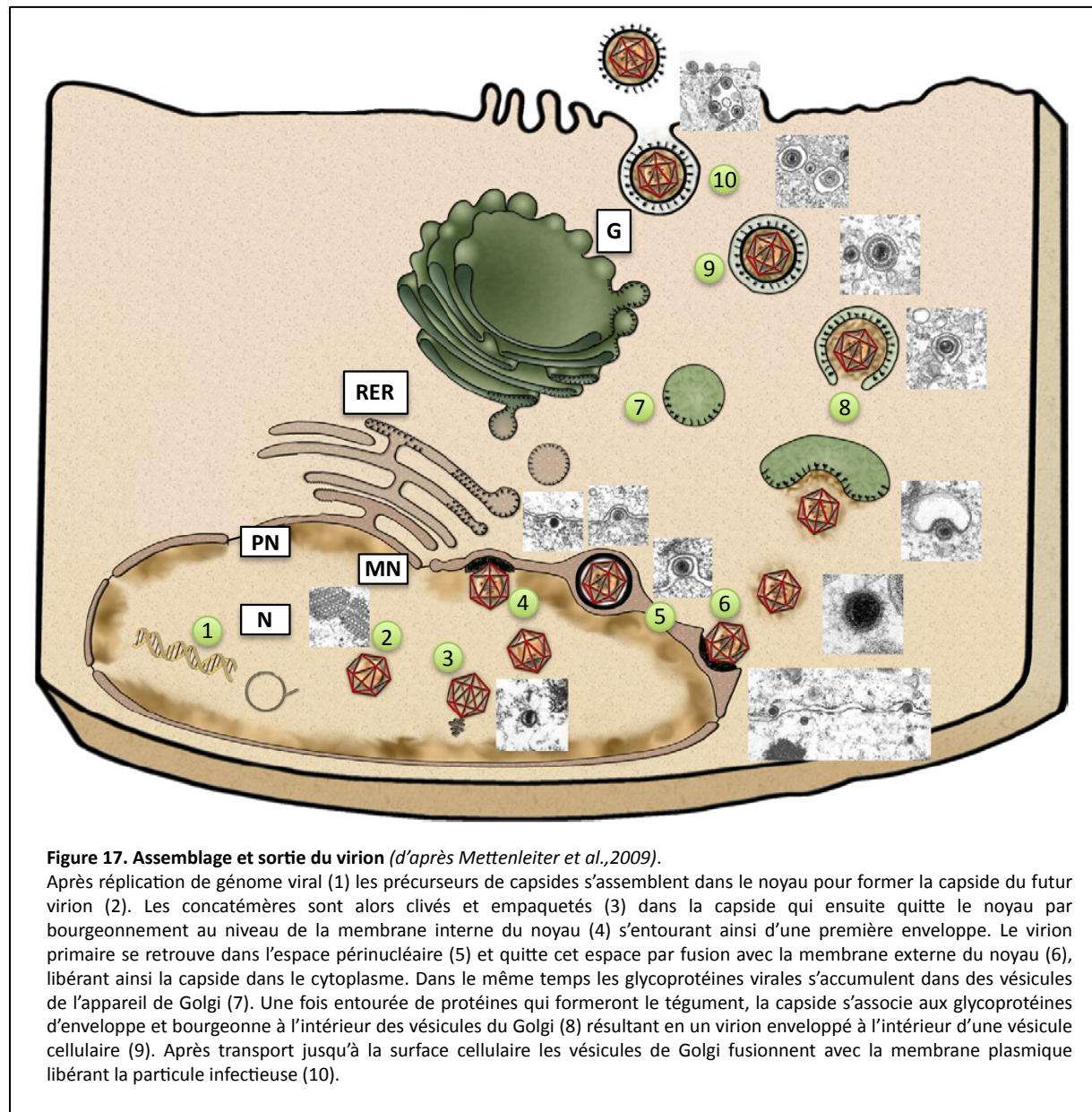
IV. 1. 2. Transport du génome viral jusqu'au noyau

Après endocytose du virus dans les lymphocytes B, une fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique de la vésicule d'endocytose permet à la nucléocapside de pénétrer dans le cytoplasme (Tanner et al., 1987). Après relargage dans le cytoplasme de la cellule hôte, la capside virale doit migrer à travers la cellule jusqu'au noyau. Pour lors, aucune information concrète n'est connue sur ce qui se passe entre la fusion et l'arrivée du génome d'EBV dans le noyau. Il est donc spéculé que le virus d'Epstein-Barr utilise les mêmes mécanismes que les autres Herpesvirus. La nucléocapside doit migrer vers le noyau, probablement grâce au réseau de microtubules (Sodeik et al., 1997) et se dirige au niveau des pores nucléaires. Puis, le génome viral est libéré dans le noyau (Mettenleiter et al., 2009). Une fois entré dans le noyau le génome viral, alors linéaire, se circularise par recombinaison au niveau des régions TR (Alfieri et al., 1991) et prend sa forme épisomique. On retrouve *in vitro* 1 à 100 copies du génome par cellule B infectée.

IV. 1. 3. Assemblage et sortie du virion

Tout comme pour les étapes entre l'entrée du virus et la circularisation du génome viral dans le noyau, peu d'études décrivent le trafic intracellulaire et la sortie de virions infectieux chez EBV. On suppose cependant que, comme HSV1 pour lequel l'assemblage et la sortie des virions sont bien décrits, une fois le génome viral linéaire empaqueté dans la capside cette dernière bourgeonne au niveau de la membrane interne du noyau, s'entourant ainsi d'une première enveloppe (**Fig 17**). Ce virion primaire traverse l'espace périnucléaire et fusionne avec la membrane externe du noyau permettant la libération de la nucléocapside

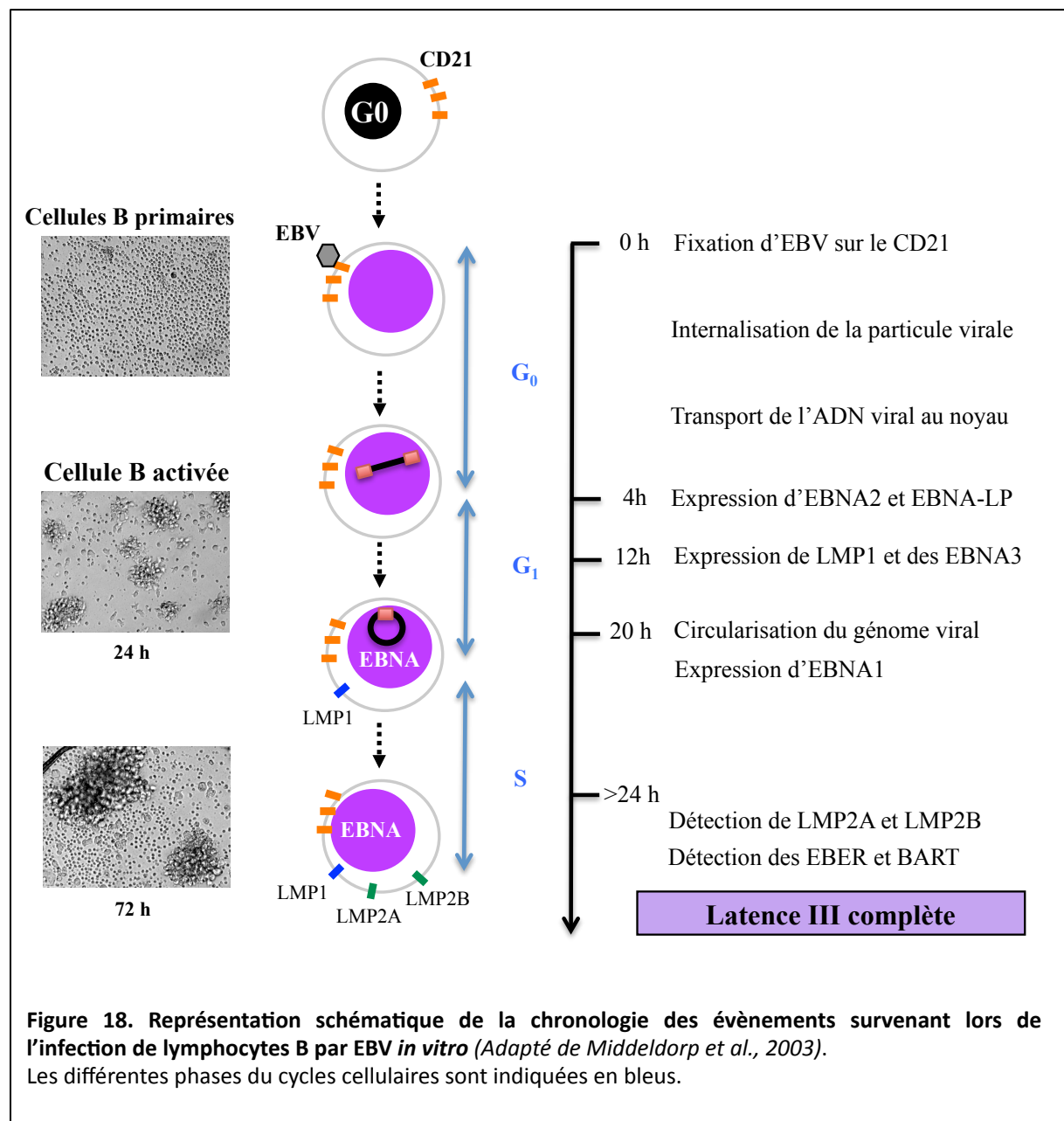
dans le cytoplasme où cette dernière va s'entourer d'une matrice fibreuse constituée par les protéines du tégument. La capside et son tégument s'associent aux glycoprotéines d'enveloppes maturées dans l'appareil de Golgi et bourgeonnent à l'intérieur des vésicules de sécrétion du Golgi. Enfin ces vésicules contenant le virion fusionnent avec la membrane plasmique des cellules, libérant un virion enveloppé (Mettenleiter et al., 2009).



IV. 2. Chronologie de l'infection par EBV *in vitro*

L'infection de lymphocytes B primaires par EBV *in vitro* commence par l'interaction du virus via la gp350/220 avec le récepteur CD21 stimulant son endocytose (**Fig 18**). Puis,

l'enveloppe de la particule virale fusionne avec la membrane cellulaire. La nucléocapside est alors transportée jusqu'au noyau cellulaire où l'ADN viral linéaire est relargué permettant l'expression des premières protéines virales (EBNA2 et EBNA-LP) quatre heures post infection à partir du promoteur Wp. Ces deux protéines virales stimulent la progression du cycle cellulaire permettant le passage de la phase G_0 à G_1 .



Douze heures post-infection, les protéines EBNA-3A, -3B et -3C ainsi que la protéine membranaire LMP1 sont exprimées à partir du promoteur Cp. Puis le génome, jusque là linéaire, se circularise par recombinaison au niveau de ses régions TR. L'expression de la protéine EBNA1 est ensuite induite permettant au génome viral de se répliquer en même

temps que le génome de la cellule hôte. Enfin, les protéines LMP2A et LMP2B sont exprimées ainsi que les ARN EBER et BART. Les cellules, *in vitro*, qui résultent de cette infection par EBV prolifèrent continuellement et expriment le programme de latence III.

In vivo, les cellules exprimant ce programme de latence III sont rapidement détruites par le système immunitaire et seules les cellules infectées dans lesquelles l'expression des gènes viraux est éteinte (lymphocytes B mémoires) survivent.

IV. 3. Chronologie de l'infection par EBV *in vivo*

Contrairement aux études concernant l'infection de cellules B *in vitro* par EBV ainsi que le rôle des différentes protéines de latence, la compréhension de la biologie de l'infection par EBV *in vivo* reste pour le moment assez rudimentaire. La primo-infection par EBV (transmission orale) a lieu le plus souvent dans les premières années de la vie d'un individu, et est généralement asymptomatique (Joncas et al., 1974). Cependant lorsque cette primo-infection survient durant l'adolescence ou plus tard, EBV peut causer la mononucléose infectieuse (Niederman et al., 1968; Niederman, 1982). L'infection par EBV semble se faire au niveau des amygdales constituant l'anneau lymphatique de Waldeyer (**Fig 19**). Le virus provenant de la salive échangée lors d'un baiser avec un individu contaminé, entre à l'intérieur des cryptes des amygdales, s'infiltre au travers de la fine couche de l'épithélium (souvent composée d'une seule couche cellulaire) et infecte les lymphocytes B naïfs situés juste en dessous de cet épithélium. Cependant, le mécanisme par lequel EBV traverse l'épithélium oropharyngé n'est pas encore exactement connu et deux hypothèses sont avancées :

- Soit le virus infecte en premier lieu les cellules épithéliales présentes dans l'épithélium, formant ainsi un foyer de réplication permettant sa multiplication et son amplification. Ce foyer libère ainsi une quantité importante de virions pouvant ensuite aller infecter les lymphocytes B circulant sous l'épithélium.

- Soit le virus infecte directement les lymphocytes B en passant à travers les cryptes de l'épithélium. Ces cryptes sont des invaginations de l'épithélium entourant les amygdales et contrairement à la peau, qui agit comme une barrière, l'épithélium des amygdales fonctionne comme une éponge, laissant ainsi facilement passer le virus. Les lymphocytes B naïfs infectés par l'EBV se localisent directement sous l'épithélium des amygdales (Babcock and Thorley-Lawson, 2000; Babcock et al., 2000; Joseph et al., 2000a, 2000b).

Le modèle actuel de l'infection persistante d'EBV est que le virus infecte et active les lymphocytes B naïfs. Ces derniers deviennent des centroblastes prolifératifs pouvant se différencier en lymphocytes B mémoires en passant par les centres germinatifs (Thorley-Lawson and Gross, 2004) (**Fig 19**).

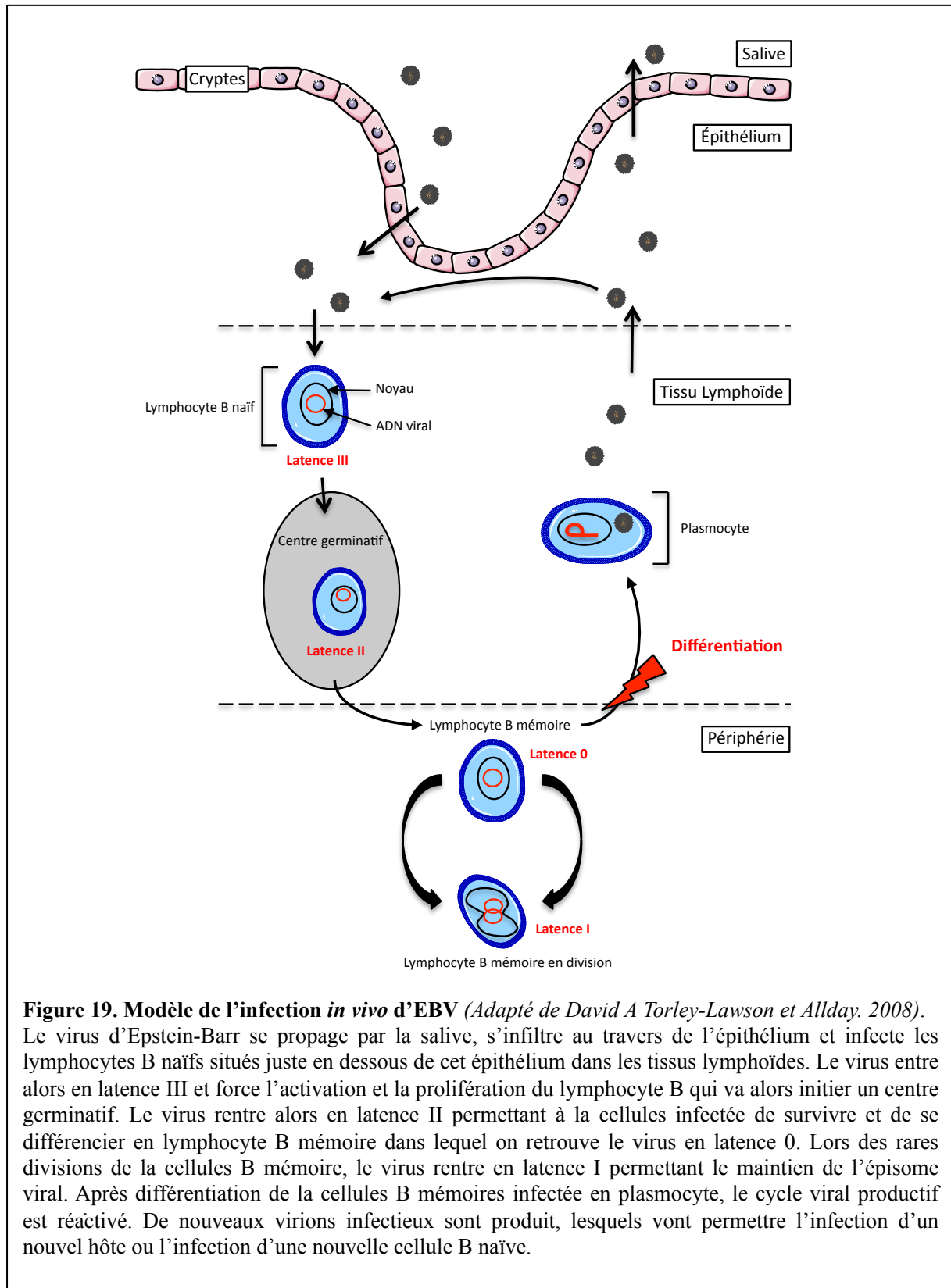
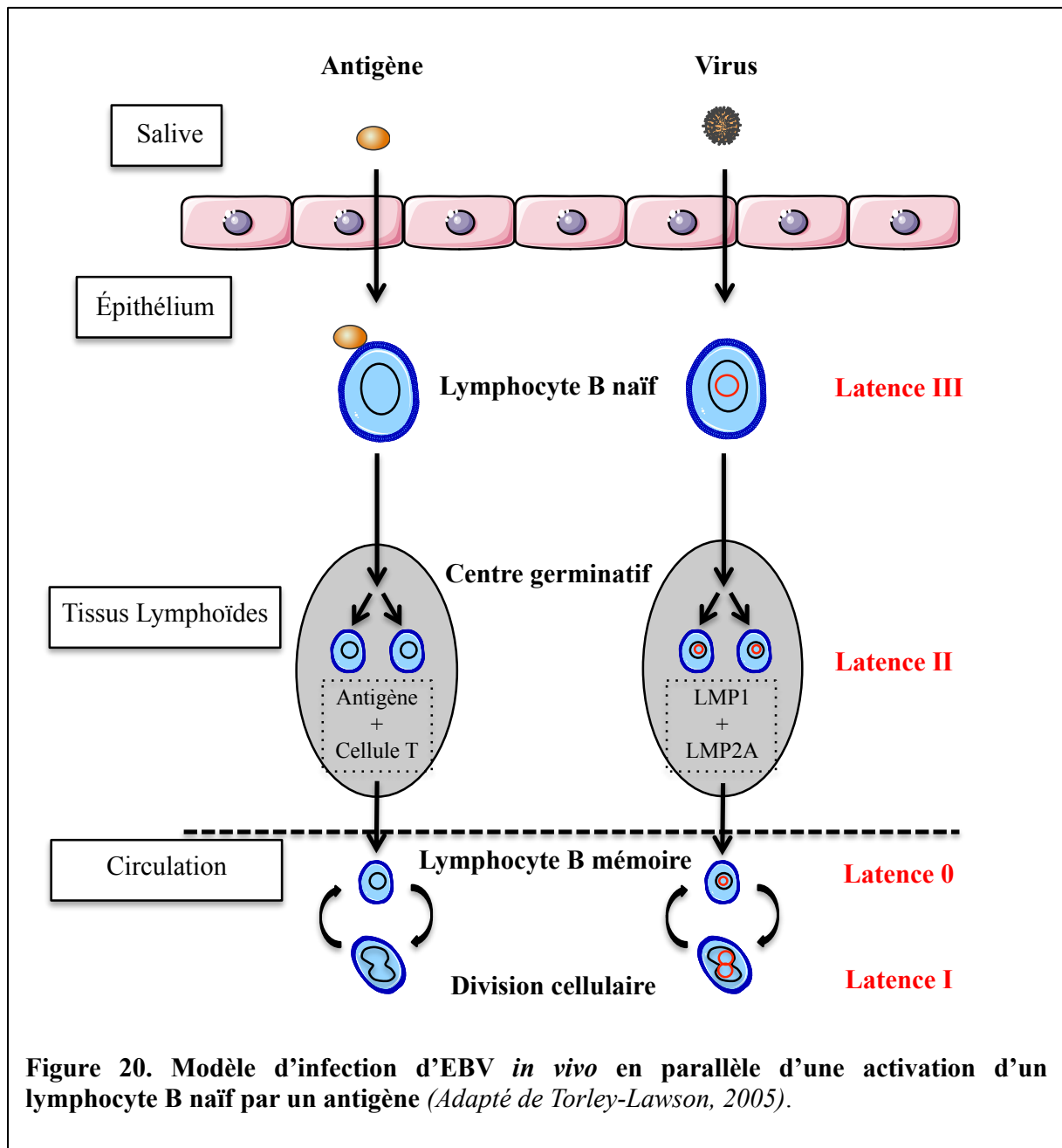


Figure 19. Modèle de l'infection *in vivo* d'EBV (Adapté de David A Torley-Lawson et Allday. 2008).

Le virus d'Epstein-Barr se propage par la salive, s'infiltre au travers de l'épithélium et infecte les lymphocytes B naïfs situés juste en dessous de cet épithélium dans les tissus lymphoïdes. Le virus entre alors en latence III et force l'activation et la prolifération du lymphocyte B qui va alors initier un centre germinatif. Le virus rentre alors en latence II permettant à la cellule infectée de survivre et de se différencier en lymphocyte B mémoire dans lequel on retrouve le virus en latence 0. Lors des rares divisions de la cellule B mémoire, le virus rentre en latence I permettant le maintien de l'épisome viral. Après différenciation de la cellule B mémoire infectée en plasmocyte, le cycle viral productif est réactivé. De nouveaux virions infectieux sont produits, lesquels vont permettre l'infection d'un nouvel hôte ou l'infection d'une nouvelle cellule B naïve.

Afin de comprendre le cycle biologique d'EBV *in vivo*, il est d'abord nécessaire de comprendre le cycle biologique de l'activation d'un lymphocyte B naïf. Lorsqu'un lymphocyte B naïf reconnaît un antigène celui-ci est activé, migre dans un follicule lymphoïde primaire et engendre un centre germinatif formant un follicule secondaire. C'est un site d'intense prolifération : au bout d'une soixantaine d'heures le centre germinatif contient 10 000 à 15 000 blastes (**Fig 20**).



Le virus d'Epstein-Barr possède la capacité extraordinaire d'imiter ce processus d'activation à travers l'expression coordonnée des neuf protéines de latence, sous la direction

d'un seul facteur de transcription, la protéine EBNA2 (Ling et al., 1994b). EBV transite donc au niveau de l'épithélium de l'anneau lymphatique de Waldeyer et infecte les cellules B naïves dans le tissu sous-jacent. Une fois infectées, les cellules B expriment un ensemble de gènes latents qui provoque l'activation de la cellule et donc sa prolifération comme si elle répondait à un antigène. Ce programme de transcription (latence III) conduit à l'expression des 9 protéines de latence (**Tableau 5**). Ces protéines virales possèdent toutes les fonctions nécessaires pour activer la cellule B sans aucune nécessité d'un signal extérieur. Cette activation et prolifération des lymphocytes B par EBV provoquent une forte réponse immunitaire primaire des lymphocytes T spécifiques des antigènes de la latence III, détruisant la plupart des cellules infectées.

Latence	Gènes exprimés	Fonction
Latence de Type III	Tous les EBNA LMP1 LMP2	Active un lymphocyte B naïf en lymphoblaste prolifératif
Latence de Type II	EBNA1 LMP1 LMP2A	Maintien le génome viral Différentiation d'un lymphoblaste infectée en cellule B mémoire
Latence de Type I	EBNA1	Maintien du génome viral
Latence de type 0	Aucun	Permet aux cellules infectées de ne pas être détectées par le système immunitaire.

Tableau 5 : Programme des différents types de Latence.

Dans le centre germinatif, la prolifération rapide des centroblastes activés par un antigène est associée à des hypermutations somatiques et une commutation isotypique des gènes des immunoglobulines permettant de sélectionner les cellules présentant la meilleure affinité pour l'antigène. Toutes les autres cellules périssent par apoptose. Les lymphocytes B sélectionnés échappent à la mort par apoptose grâce aux signaux de survie transmis via l'activation du récepteur aux antigènes (BCR) et via l'activation du CD40 par le CD40 ligand de cellules T-Helper (Liu et al., 1989; MacLennan, 1994; Liu and Arpin, 1997). Puis, ces cellules se différencient en cellules B mémoires ou en plasmocytes et quittent le centre germinatif. La formation d'un centre germinatif est donc une étape cruciale conduisant à la sécrétion d'anticorps de haute affinité et à la constitution d'une mémoire lymphocytaire B.

Parallèlement (**Fig 20**), les cellules B infectées et activées par EBV vont migrer vers le follicule où le programme de transcription des gènes de latence d'EBV va changer (latence II) (Babcock et al., 2000). La raison d'un tel changement de programme de transcription est pour

le moment peu comprise, mais il semblerait que des signaux d'origine folliculaire en soient la cause. Cependant, il est connu que cette transition nécessite l'inhibition de la transcription du gène codant pour la protéine EBNA2 (Polack et al., 1996). En latence de type II, il ne reste plus que 3 protéines virales exprimées : EBNA1, LMP1 et LMP2A. La protéine EBNA1 permet la réplication du génome viral durant les divisions cellulaires (Yates et al., 1985). Les protéines LMP1 et LMP2A sont deux protéines membranaires agissant comme des récepteurs constitutivement actif (Gires et al., 1997; Caldwell et al., 1998; Kilger, 1998) qui respectivement miment le récepteur CD40 pour l'une et interfère avec la voie du BCR pour l'autre. De manière intéressante, il a été montré que l'expression seule de la protéine LMP2A dans des cellules B permet la formation de follicules (Casola et al., 2004). Les protéines LMP1 et LMP2A sont responsables respectivement de la commutation isotypique (marqueurs du centre germinatif) et de l'hypermutation somatique des gènes des immunoglobulines (He et al., 2003; Casola et al., 2004). Les deux protéines virales LMP1 et LMP2A permettent donc à elles seules de fournir les signaux de survie et de différenciation permettant à une cellule B de devenir une cellule mémoire.

Enfin, une fois la cellule B différenciée en cellule mémoire, cette dernière quitte le centre germinatif. A ce moment, le programme de transcription d'EBV change pour la dernière fois et plus aucune protéine virale n'est exprimée (latence 0). La finalité de ce processus d'infection des cellules B par le virus d'Epstein-Barr est l'établissement d'une latence dans les lymphocytes B mémoires circulant du sang périphérique dans lesquels plus aucune expression de protéine virale n'est observée (Babcock et al., 1998, 1999). Ces cellules B mémoires du sang périphérique représentent le réservoir naturel d'EBV. Le nombre de cellule B mémoires infectées par EBV chez un individu sain est assez bas et représente une cellule B mémoire sur un million (Khan et al., 1996). Lorsqu'un lymphocyte B mémoire infecté par EBV entre en division, ce dernier exprime la protéine EBNA1 (nécessaire au maintien du génome viral) (Yates et al., 1985; Hochberg et al., 2004). De manière intéressante, la protéine EBNA1, qui est ici le seul point d'attaque du système immunitaire, n'est que très peu reconnue par le système immunitaire (Levitskaya et al., 1995). Contrairement aux lymphocytes B mémoires circulant du sang périphérique infectés par EBV (latence 0), les cellules B mémoires présentes au niveau des amygdales présentent un profil d'expression caractéristique de la latence II (Babcock and Thorley-Lawson, 2000; Babcock et al., 2000). Il a donc été spéculé que l'expression de LMP1 et LMP2A dans ces cellules B mémoires permettrait de fournir des signaux de survie (Thorley-Lawson, 2001).

En accédant aux cellules B mémoires le virus d'Epstein-Barr s'assure donc une longue persistance. Cependant le virus doit se réactiver, se répliquer et former de nouveaux virions pour pouvoir se propager et infecter de nouveaux hôtes. Cette activation du cycle productif d'EBV est associée à la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes (Anagnostopoulos et al., 1995; Laichalk and Thorley-Lawson, 2004). Les cellules B mémoires se différencient en plasmocytes par deux voies distinctes : la première implique la reconnaissance de l'antigène pour lequel elles sont spécifiques et la deuxième implique des stimuli apportés par un lymphocyte T-Helper (Bernasconi et al., 2002). Par ces deux mécanismes un lymphocyte B mémoire infecté par EBV peut se différencier en plasmocyte et entrer en cycle productif (**Fig 21**). Cependant, les différents signaux impliqués dans la réactivation d'EBV *in vivo* sont pour le moment inconnus.

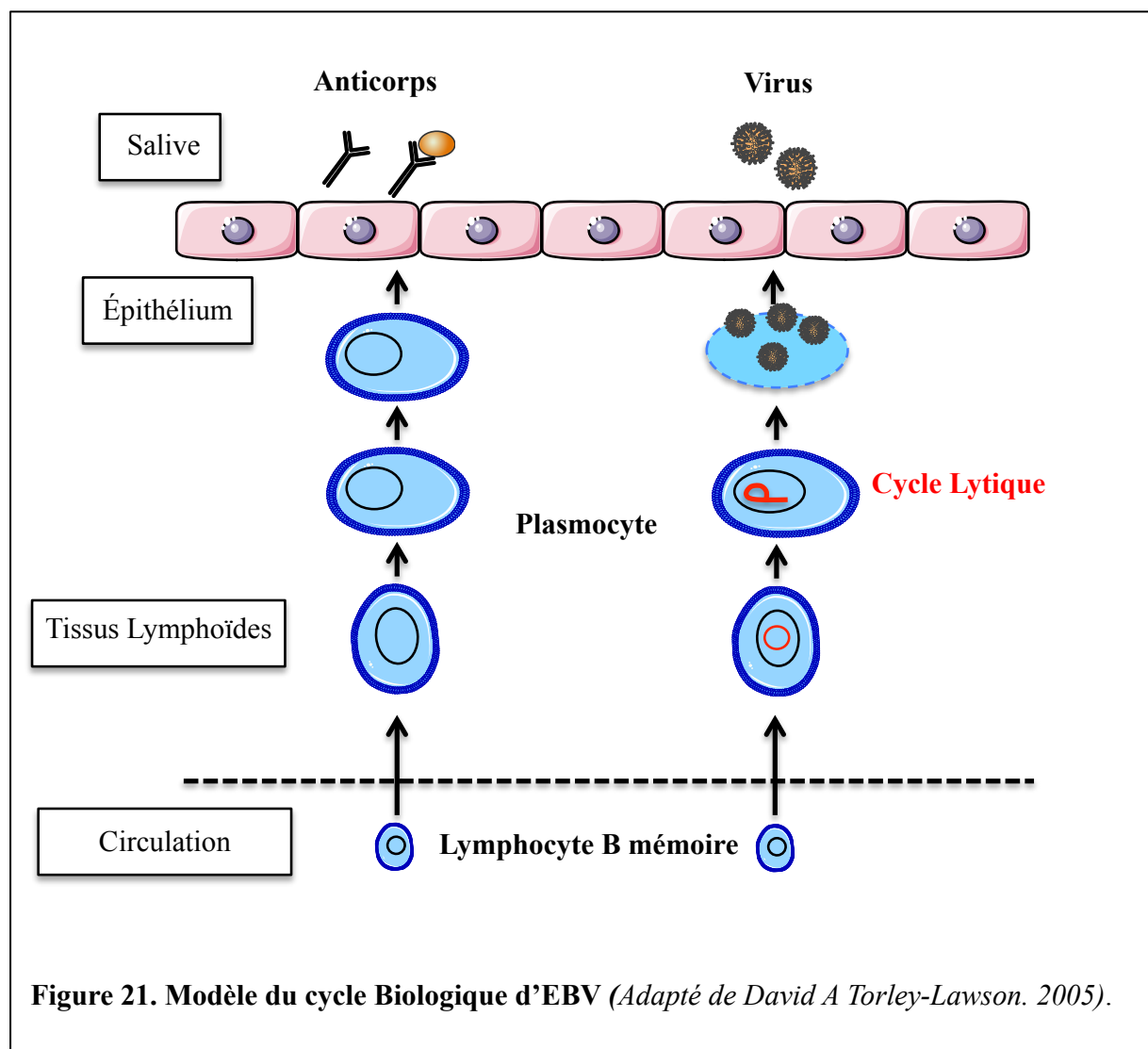


Figure 21. Modèle du cycle Biologique d'EBV (Adapté de David A Torley-Lawson. 2005).

Cette différenciation entraîne la migration des plasmocytes au niveau de l'épithélium (Brandtzaeg et al., 1999a, 1999b). Le rôle exact de l'épithélium dans le cycle biologique d'EBV n'est pas encore clairement établi. Il est cependant suggéré que les cellules épithéliales sont le site de réplication et d'amplification du virus plutôt qu'un site d'infection latente (Thorley-Lawson, 2005). Ces cellules permettraient donc la libération de nouvelles particules virales à la surface de l'épithélium, qui, dans le cas des amygdales, est la salive (**Fig 19 et 21**). L'infection par EBV est contrôlée par les mécanismes de l'immunité humorale et cellulaire. En effet les lymphocytes T cytotoxiques détruisent les cellules infectées qui expriment des protéines virales (Khanna et al., 1999) alors que les anticorps contre le virion limitent la propagation du virus (Pearson et al., 1970). En détruisant ces cellules infectées et en empêchant la dissémination des particules virales infectieuses grâce aux anticorps, la réponse immunitaire réduit le niveau d'infection par EBV.

Pour résumer, le modèle du cycle biologique d'EBV *in vivo* est donc comme nous venons de le voir le suivant : le virus infecte des cellules B naïves au niveau de l'anneau de Waldeyer, les active, et les pousse rapidement à sortir du cycle cellulaire et à se différencier en lymphocytes B mémoires dans lesquels le virus est latent. Ces cellules mémoires ne sont donc pas reconnues comme porteuses d'un pathogène par l'organisme, puisqu'aucun gène de latence n'est exprimé, et le virus peut ainsi persister durant toute la vie de l'hôte. Enfin, il a aussi été suggéré qu'EBV puisse accéder aux cellules B mémoires en infectant directement ces dernières (Young and Rickinson, 2004).

Le virus d'Epstein-Barr est cependant associé à un grand nombre de pathologies signifiant que dans certains cas un ou plusieurs événements perturbent le cycle biologique normal d'EBV *in vivo* (**Fig 22**).

Un risque potentiel pour l'hôte intervient lorsqu'EBV infecte des cellules B autres que naïves (bystander B cell) qui ne peuvent pas se différencier et sortir du cycle cellulaire (Thorley-Lawson and Gross, 2004; Thorley-Lawson, 2005). Ces cellules vont exprimer le programme de latence III menant à leur prolifération. Chez des individus sains le système immunitaire reconnaît ces cellules et les détruit rapidement. Cependant, chez des individus immunodéprimés (au stade SIDA de l'infection par le HIV ou post transplantés), ces cellules ne sont pas détruites et peuvent mener au développement de lymphomes (PTLD) (**Fig 22**) (Thomas et al., 1990; Hopwood, 2000).

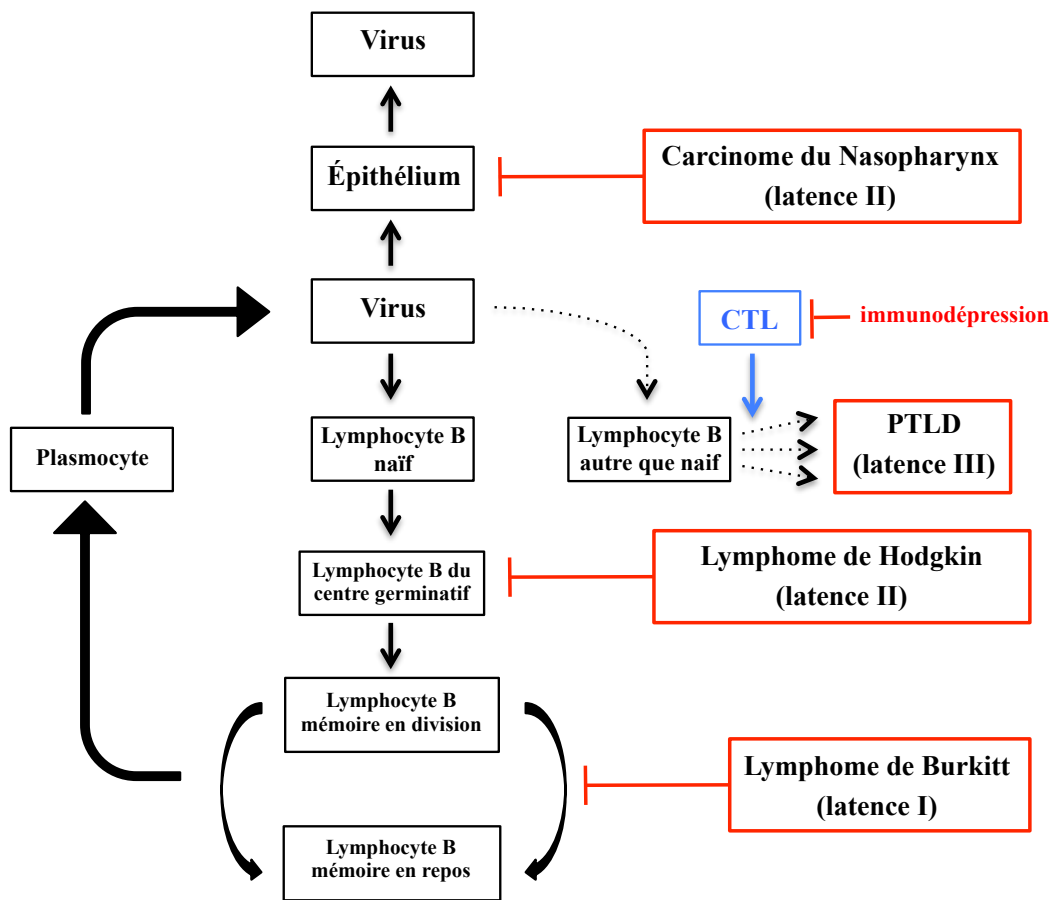


Figure 22. Modèle des différentes étapes du cycle biologique d'EBV pouvant aboutir à des cancers (Adapté de Torley-Lawson., 2005).

Les différentes étapes ayant lieu lors de l'infection de cellules B par EBV sont indiquées en noir. EBV infecte et active les cellules B naïves de l'anneau de Waldeyer, ces dernières se différencient en cellules B mémoires et sortent du cycle cellulaire. Ces cellules mémoires infectées par EBV sont non pathogéniques pour l'organisme. Cependant, certains événements peuvent survenir lors du cycle biologique d'EBV menant à la formation de cancers. **PTLD** : si une cellule B est infectée et exprime le programme de prolifération (latence III), cette dernière continuera de proliférer. En effet, ces cellules sont normalement éliminées par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), mais si cette réponse par les CTL est supprimée, alors la cellule continuera de proliférer pouvant aboutir à un lymphome. Le **Lymphome de Hodgkin** provient d'une cellule B infectée par EBV bloquée au niveau du centre germinatif. Ceci résulte en l'expression constitutive des protéines LMP1 et LMP2A, spécifiques de la latence II. Le **Lymphome de Burkitt** évolue à partir d'une cellule B du centre germinatif qui entre dans le compartiment des cellules mémoires mais qui continue de proliférer. Ces cellules expriment alors seulement la protéine virale EBNA1 (latence I). Enfin, il est suggéré que le **Carcinome du Nasopharynx** provient d'une cellule épithéliale non différenciée, infectée de manière latente par EBV et ne pouvant pas se différencier. Il n'est cependant pas connu pourquoi ces cellules expriment les gènes de la latence II.

Dans le centre germinatif, une cellule B infectée par EBV exprime le programme de latence II. Ce type de latence est aussi retrouvé dans les cellules issues de lymphomes de Hodgkin EBV positifs. De manière intéressante les cellules issues des lymphomes de Hodgkin possèdent les hypermutations des gènes des immunoglobulines comme les cellules du centre germinatif (Küppers and Rajewsky, 1998). Le scénario qui est donc envisagé pour l'association d'EBV avec ce lymphome est qu'une cellule B du centre germinatif, infectée par EBV, acquiert une mutation bloquant sa différenciation (Flavell and Murray, 2000; Staudt, 2000). Cette cellule exprimera alors de manière constitutive LMP1 et LMP2A qui pourront fournir des signaux de survie et de prolifération qui stimuleront la croissance des cellules (**Fig 22**).

Une fois différencié en cellule B mémoire la cellule infectée par EBV n'exprime plus aucune protéine virale (latence 0) à l'exception de la protéine EBNA1 lors des divisions cellulaires (latence I). Ce programme de latence I est retrouvé dans les lymphomes de Burkitt EBV positifs (Gregory et al., 1990). La caractéristique de ce lymphome est la translocation du gène *c-myc* au niveau des gènes des immunoglobulines menant à son expression constitutive (Taub et al., 1982). De plus, ces cellules possèdent aussi les mêmes hypermutations que celles des cellules B mémoires ou des cellules du centre germinatif (Klein et al., 1995). Il est donc suggéré que le lymphome de Burkitt survient lorsqu'une translocation accidentelle du gène *c-myc* apparaît dans une cellule du centre germinatif infectée par EBV, en train de se différencier en lymphocyte B mémoire, lymphocyte B mémoire qui ensuite prolifère continuellement puisque l'oncogène c-Myc est activé (**Fig 22**) (Thorley-Lawson and Gross, 2004; Thorley-Lawson, 2005).

Enfin, le virus d'Epstein-Barr est aussi associé à un cancer développé à partir d'un tissu épithélial, le carcinome du nasopharynx (NPC) (latence II) (Old et al., 1966; Andersson-Anvret et al., 1977). Malgré le manque de connaissance concernant le rôle exact des cellules épithéliales dans le cycle biologique d'EBV, il est suggéré que les NPC seraient issus de l'infection latente d'une cellule épithéliale non différenciée (**Fig 22**) (Thorley-Lawson, 2005).

Partie 1 : fonctions des protéines virales de la famille EBNA3 dans l'immortalisation des lymphocytes B par le virus d'Epstein-Barr

Chapitre I : Introduction sur les protéines EBNA3

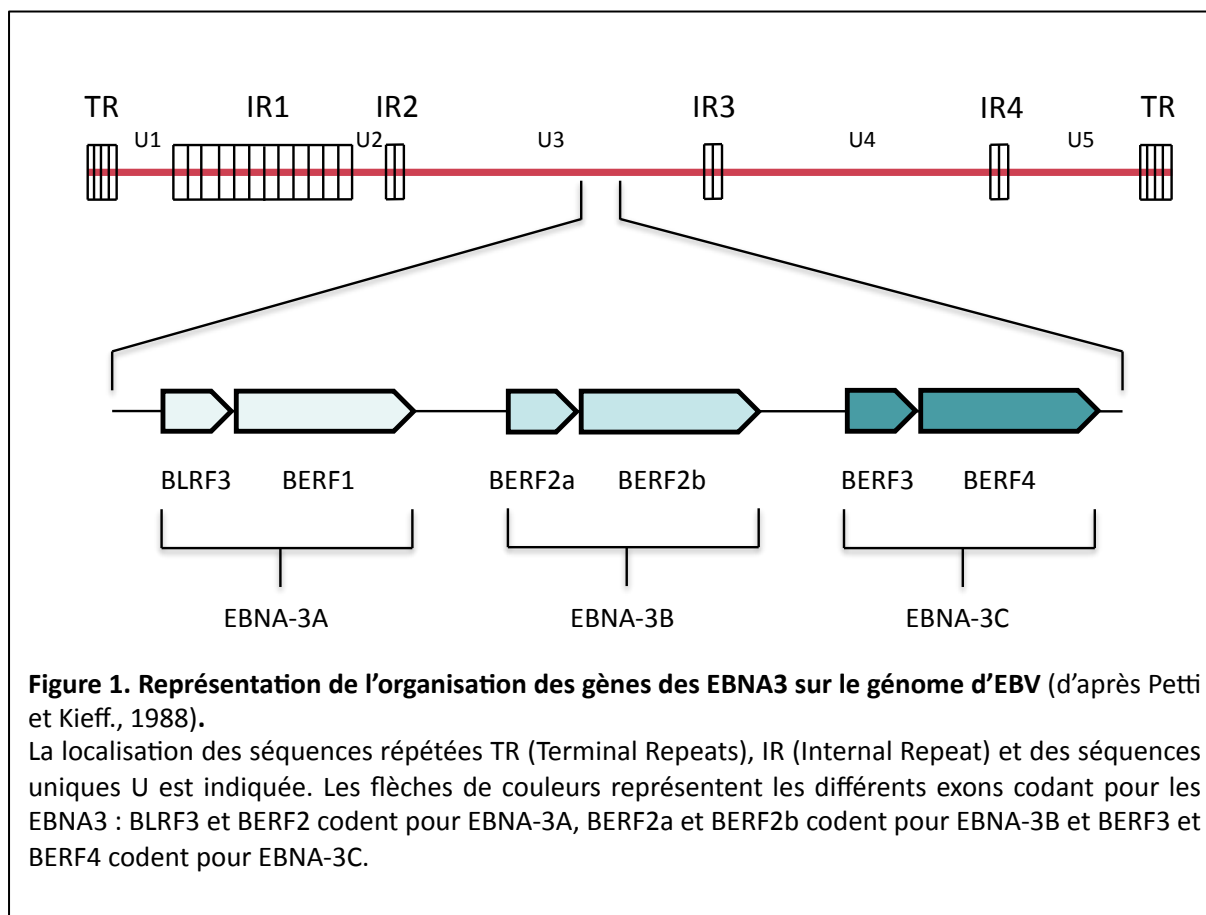
In vitro, EBV a la capacité d'infecter des lymphocytes B quiescents et d'induire leur prolifération continue (genèse de lignées lymphoblastoïdes : LCL). Dans ces cellules, un nombre limité de protéines virales est exprimé parmi lesquelles les trois protéines de la famille EBNA3, EBNA-3A, -3B et -3C. Pendant longtemps EBNA-3A et -3C ont été considérées comme indispensables à l'immortalisation *in vitro* de lymphocytes B et au maintien de la viabilité des cellules immortalisées. Cependant, des lignées de cellules ont récemment pu être obtenues en utilisant un virus recombinant $\Delta 3A$, bien que l'efficacité d'immortalisation de ce virus ainsi que la croissance des lignées cellulaires $\Delta 3A$ soient affectées. Ces résultats récents suggèrent qu'EBNA-3A n'est pas indispensable mais est importante à l'immortalisation des cellules B *in vitro*. Les trois gènes codant les protéines EBNA3 sont retrouvés dans toutes les souches virales connues à ce jour ce qui suggère que ces trois protéines possèdent un rôle important dans l'infection *in vivo* de lymphocytes B ainsi que dans la genèse de cancers liés à EBV.

Les EBNA3 sont des protéines multifonctionnelles connues entre autres pour être des régulateurs transcriptionnels. Leurs différents rôles convergent tous vers une stimulation de la prolifération cellulaire et une survie accrue des cellules en condition de stress ou suite à des dommages à l'ADN.

I. Les EBNA3, trois protéines apparentées

I. 1. Une organisation génomique identique

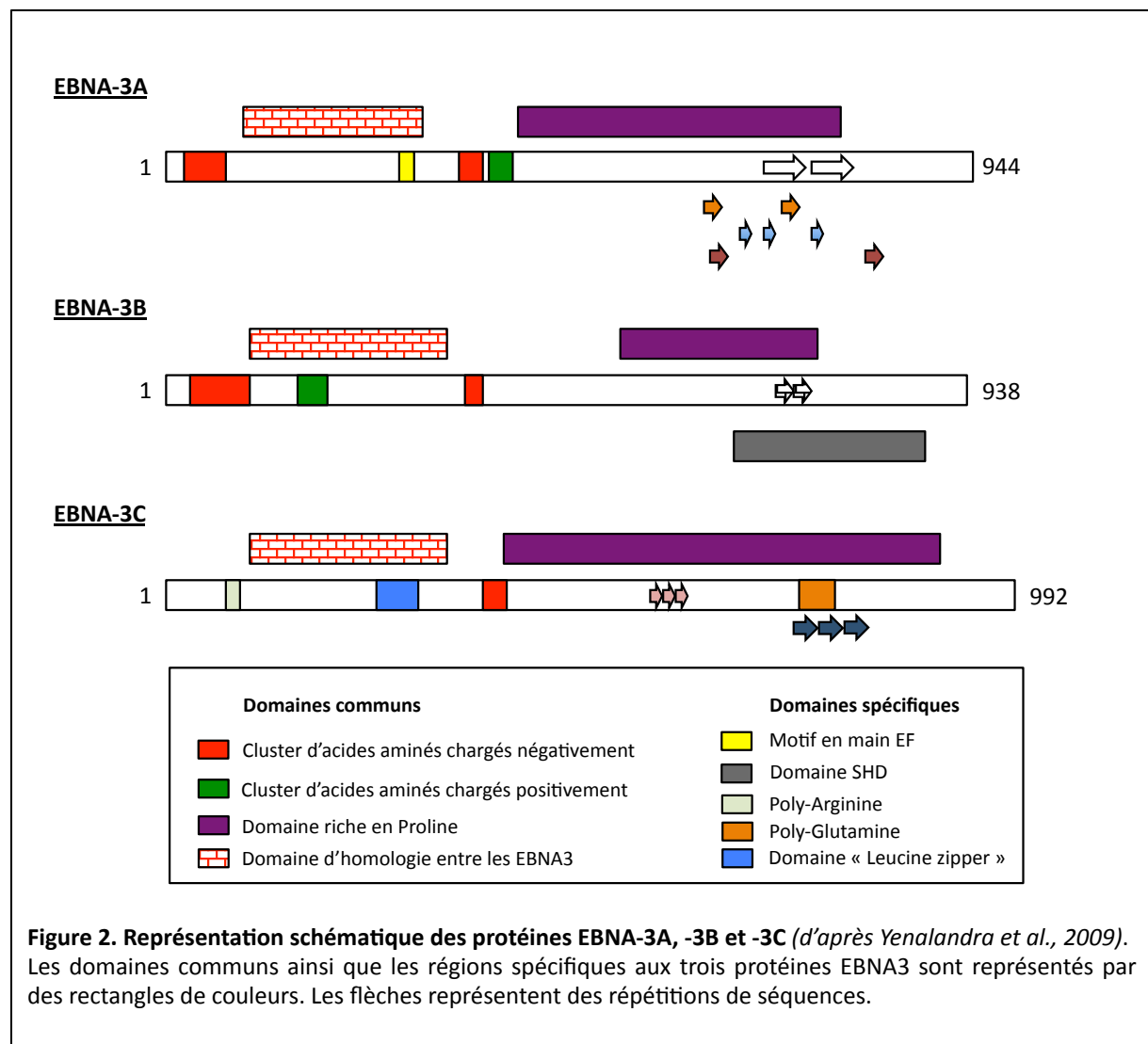
La famille des protéines EBNA3 est composée de trois protéines de 938 à 992 acides aminés (140 à 180 kDa). Ces protéines sont très stables et très abondantes dans les LCL. Les protéines EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C sont produites par des gènes qui pourraient avoir une origine commune (triplication à partir d'un gène ancestral commun). En effet, les trois gènes codant les protéines EBNA3 sont contigus dans le génome viral et l'organisation des exons codants (un premier exon portant une ORF courte et un second portant une ORF longue) est conservée (Bodescot and Perricaudet, 1986; Hennessy et al., 1986; Joab et al., 1987; Allday et al., 1988; Petti and Kieff, 1988; Petti et al., 1988; Ricksten et al., 1988; Kerdiles et al., 1990) (**Fig 1**). Les ORF BLRF3 et BERF1 codent pour EBNA-3A, BERF2a et BERF2b pour EBNA-3B et BERF3 et BERF4 codent pour la protéine EBNA-3C.



I. 2. Des protéines structuralement similaires

Les protéines EBNA3 sont des phosphoprotéines qui sont retrouvées dans la cellule associées à la matrice nucléaire et au nucléoplasme (Petti et al., 1990; Sample and Parker, 1994; Krauer et al., 2004b). Il a notamment été montré que la protéine EBNA-3A contient six signaux de localisation nucléaire (NLS) (Buck et al., 2006), EBNA-3B en contient au moins deux (Burgess et al., 2006) et EBNA-3C trois (Krauer et al., 2004a). Bien que leurs séquences primaires en acides aminés aient considérablement divergées, les trois protéines EBNA3 possèdent une région homologue dans leur partie N-Terminale (**Fig 2**). Dans cette région d'homologie EBNA-3A et -3B partagent 28% d'identité entre les acides aminés, contre 23% entre EBNA-3A et -3C et 27% entre EBNA-3B et -3C (Le Roux et al., 1994). Une analyse comparative des trois protéines EBNA3 réalisée en 2009 a permis de mettre en évidence une organisation de ces trois protéines en domaines similaires (Yenamandra et al., 2009) (**Fig 2**). Les trois protéines possèdent notamment une longue région riche en acide aminé Proline ainsi que des clusters d'acides aminés chargés positivement et négativement. Les trois protéines

EBNA3 possèdent également des répétitions de séquences, bien que différentes, dans leur partie C-Terminale.



Les EBNA3 possèdent aussi des domaines spécifiques. La protéine EBNA-3A possède un motif de « main EF », motif correspondant à une structure hélice-boucle-hélice capable de lier le calcium; la protéine EBNA-3B possède un domaine SHD (pour Stonin Homology Domain), domaine retrouvé chez les protéines Stonines impliquées dans les phénomènes d'endocytose; la protéine EBNA-3C possède quant à elle une petite région composée d'une répétition d'acides aminés Arginine, une région riche en Glutamine, ainsi qu'une région homologue au domaine bZIP (basic zipper) retrouvée dans différentes familles de facteurs de transcription (Marshall and Sample, 1995; West et al., 2004) (**Fig 2**). Cette analyse informatique menée par Yenamandra et ses collaborateurs (Yenamandra et al., 2009) a aussi

permis de découvrir que les trois protéines de la famille EBNA3 ont une structure secondaire significativement similaire. En effet, EBNA-3A et -3B partagent 88,30% de similarité dans leurs structures secondaires, contre 71,52% entre EBNA-3A et EBNA-3C et 71,81% entre EBNA-3B et EBNA-3C. La structure secondaire des protéines EBNA3 est donc relativement bien conservée alors que la séquence primaire l'est beaucoup moins. Ces structures secondaires sont riches en hélices alpha et présentent au minimum deux courts feuillets bêta.

I. 3. Polymorphisme des protéines EBNA3

Comme pour la protéine EBNA2, il existe une variation allélique entre les protéines EBNA3 des souches EBV-1 et EBV-2 (Rowe et al., 1989). Les protéines EBNA-3A, -3B et -3C des souches EBV-1 et EBV-2 ont respectivement 84%, 80% et 72% d'identité de séquence protéique (acides aminés identiques) (Sample et al., 1990). Cependant, cette différence ne semble pas contribuer aux différences biologiques attribuées aux souches EBV-1 et EBV-2. En effet un virus recombinant EBV-2 portant l'ensemble des gènes codant pour les protéines EBNA3 de l'EBV de type-1 montre les même caractéristiques de transformation qu'un virus EBV-2 (Tomkinson and Kieff, 1992a).

I. 4. Des protéines apparentées aux fonctions différentes dans l'immortalisation

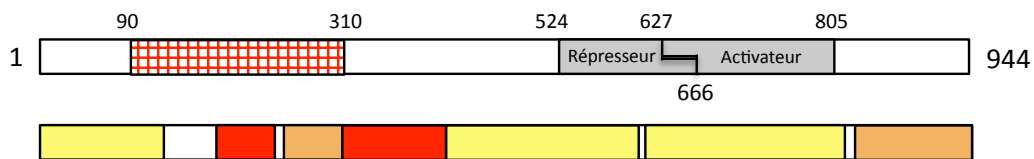
Afin de savoir si les trois protéines EBNA3 étaient essentielles à l'immortalisation des cellules B *in vitro* par EBV, Tomkinson et ses collaborateurs ont construit trois virus recombinants portant un codon Stop au début de la phase de lecture ouverte d'EBNA-3A, -3B, ou -3C (Tomkinson and Kieff, 1992a; Tomkinson et al., 1993). Dans ces expériences, il n'avait pas été possible d'établir des lignées avec les recombinants mutés pour EBNA-3A et -3C, alors que l'utilisation du virus muté pour EBNA-3B a permis d'établir des lignées lymphoblastoïdes. Tomkinson et ses collègues ont alors suggéré qu'EBNA-3A et -3C étaient indispensables à l'immortalisation des lymphocytes B par EBV, *in vitro*, alors que la protéine EBNA-3B n'était quant à elle pas requise. De plus, EBNA-3A et EBNA-3C possèdent les mêmes propriétés transformantes que les oncoprotéines virales E7 du papillomavirus humain 16 et E1A de l'adénovirus. En effet, il a été montré qu'EBNA-3A et -3C sont capables d'immortaliser et de transformer des fibroblastes primaires de rat en coopération avec l'oncoprotéine Ha-Ras (Parker et al., 1996; Hickabottom et al., 2002). Bien que ces deux

protéines possèdent la même capacité transformante, il est à noter que la majorité des études sur les protéines EBNA3 concerne la protéine EBNA-3C.

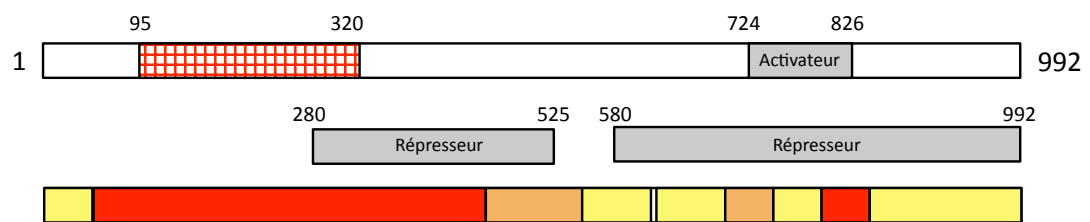
Plus récemment, l'utilisation de LCL immortalisées par des EBV recombinants, exprimant soit une protéine EBNA-3A soit EBNA-3C dont la fonction est inducible, a permis de montrer que ces deux protéines contribuent au maintien de la prolifération des cellules immortalisées par EBV (Maruo et al., 2003, 2006). Ces génomes viraux recombinants expriment une protéine EBNA-3AHT ou EBNA-3CHT fusionnée à une version mutée du récepteur aux oestrogènes, reconnue spécifiquement par le 4 hydroxytamoxifène (4HT). La protéine n'est alors active qu'en présence de 4HT, qui va induire sa translocation vers le noyau de la cellule. Sans 4HT, les LCL cessent de proliférer et meurent. Dans ce système, seule l'expression ectopique d'une protéine EBNA-3C peut transcomplémenter l'inactivation conditionnelle de la protéine EBNA-3CHT, et seule l'expression d'EBNA-3A peut transcomplémenter l'inactivation conditionnelle de la protéine EBNA-3AHT (Maruo et al., 2003, 2006). Ceci suggère que les deux protéines EBNA3 jouent des rôles différents dans le maintien de la prolifération cellulaire. De plus, ce système a permis de mettre en évidence les régions des protéines EBNA-3A et -3C importantes pour la prolifération des LCL (Maruo et al., 2005, 2009; Lee et al., 2009), grâce à la transcomplémentation de ces cellules avec différents mutants de délétion des protéines EBNA3 (**Fig 3**).

Cependant, alors que l'ensemble de ces travaux suggèrent fortement que la protéine EBNA-3A est essentielle à l'immortalisation ainsi qu'au maintien de la prolifération des LCL, il a récemment été montré qu'un virus déficient pour la protéine EBNA-3A (EBV- Δ 3A) est capable d'infecter et d'immortaliser des lymphocytes B primaires *in vitro* (Hertle et al., 2009). Ce résultat surprenant remet en cause le rôle essentiel de la protéine EBNA-3A dans le processus d'immortalisation. Cependant, l'efficacité d'immortalisation d'EBV- Δ 3A est environ quatre fois plus faible que celui d'un virus sauvage. De plus, les LCL immortalisées par un virus recombinant pour EBNA-3A (LCL Δ 3A) poussent beaucoup plus lentement que des LCL sauvages et ont un taux d'apoptose élevé. Ces résultats suggèrent que la protéine EBNA-3A, même si elle n'est pas essentielle à l'immortalisation de cellules B, joue tout de même un rôle important.

EBNA-3A



EBNA-3C



- Région critique pour la prolifération des LCL
- Région intermédiaire pour la prolifération des LCL
- Région non essentielle pour la prolifération des LCL
- Région d'homologie
- Domaine activateur ou répresseur de la transcription

Figure 3. Représentation schématique des régions importantes des protéines EBNA-3A et EBNA-3C pour la prolifération des LCL.

Les régions critiques (rectangles rouges), intermédiaires (orange) et non essentielles (jaunes) pour la prolifération des LCL sont indiquées. La région d'homologie entre les EBNA3 (rectangles rouges et blancs) et les régions d'activation et de répression de la transcription (rectangles gris) sont indiquées.

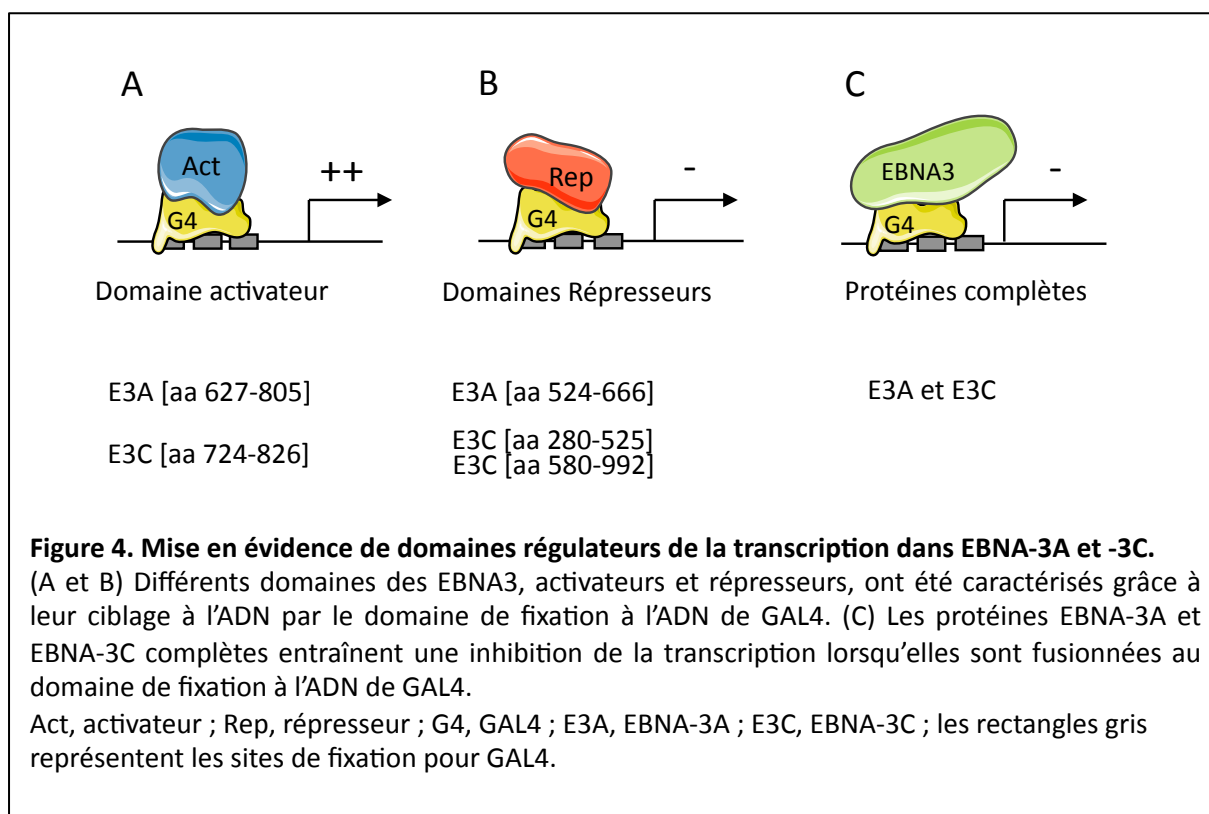
II. Régulation de la transcription par les protéines EBNA3

II. 1. Les protéines EBNA3 et la transcription aux promoteurs viraux

II. 1. 1. Les EBNA3 sont des régulateurs transcriptionnels

Les protéines de la famille EBNA3 ont été considérées en premier lieu comme des régulateurs transcriptionnels. En effet ces protéines possèdent toutes les trois un domaine riche en résidus Proline, domaine caractéristique de facteurs de transcription. De plus, EBNA-3C a un domaine « bZIP » (Marshall and Sample, 1995), retrouvé chez de nombreuses protéines fixant l'ADN (Landschulz et al., 1988).

Expérimentalement, plusieurs domaines de ces protéines ont pu être définis comme activateurs ou répresseurs de la transcription, lorsque ces derniers sont exprimés en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 (**Fig 4**) (Marshall and Sample, 1995; Bain et al., 1996; Waltzer et al., 1996; Bourillot et al., 1998).



Par ce système GAL4, Marshall et Sample ont pu ainsi mettre en évidence que la protéine EBNA-3C possède dans sa région C-Terminale un domaine activateur de la transcription situé entre les acides aminés 724 et 826 (**Fig 4A**) (Marshall and Sample, 1995). De plus, deux domaines répresseurs de la transcription ont été identifiés pour la protéine EBNA-3C, un premier entre les acides aminés 280-525 réprimant la transcription presque aussi efficacement que la protéine EBNA-3C entière et un second entre les acides aminés 580-992 (**Fig 4B**) (Bain et al., 1996). Enfin, lorsque la protéine entière EBNA-3C est ciblée sur l'ADN, elle réprime l'expression du gène cible (**Fig 4C**) (Bain et al., 1996; Waltzer et al., 1996). La protéine virale EBNA-3A semble elle aussi jouer un rôle de répresseur de la transcription. En effet Bourillot et ses collègues ont montré que, ciblée sur l'ADN, EBNA-3A réprime l'activation d'un gène cible (**Fig 4C**) (Waltzer et al., 1996; Bourillot et al., 1998). Un domaine répresseur a de plus été identifié par cette équipe entre les acides aminés 524 et 666 (**Fig 4B**). Cependant, la protéine EBNA-3A aussi est capable d'activer la transcription. En

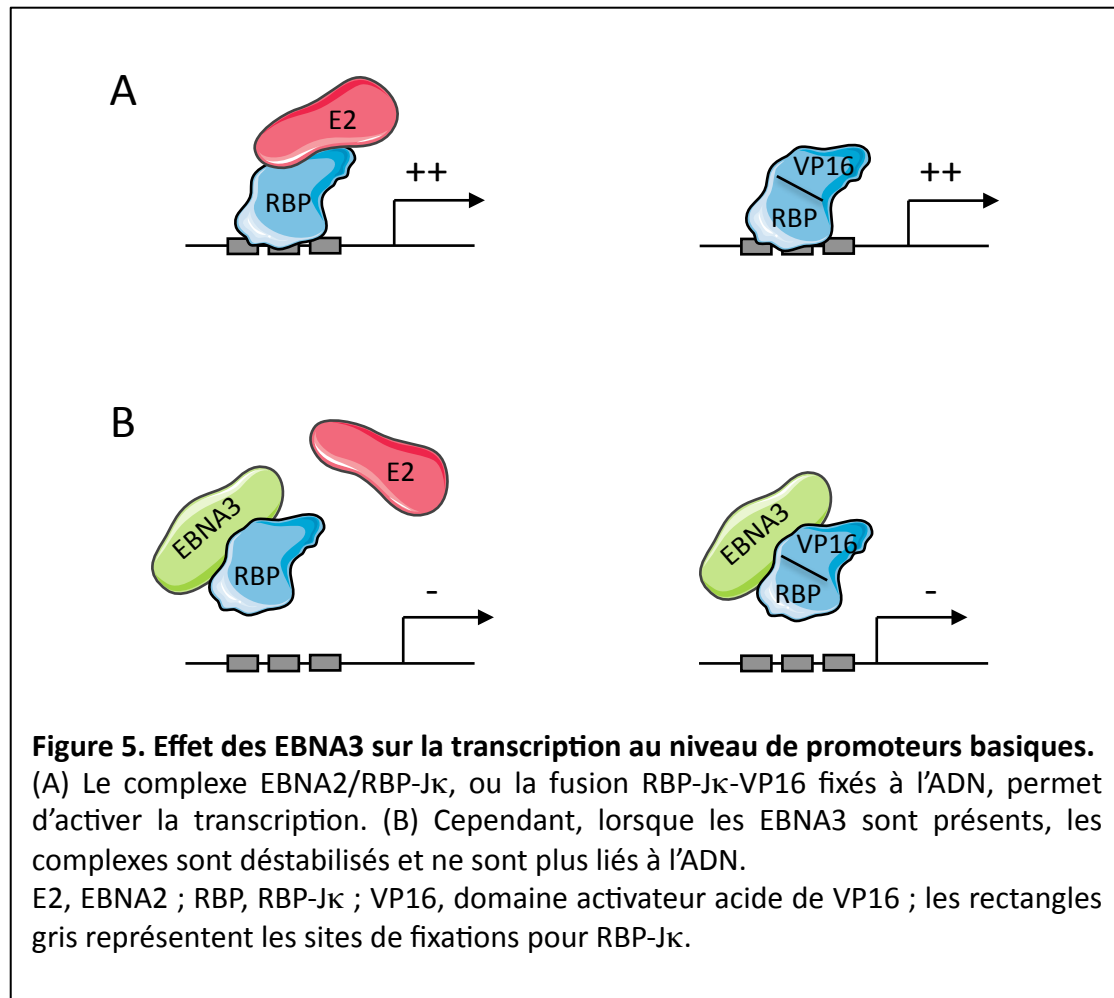
effet, Cludts et Farrell ont montré qu'un mutant d'EBNA-3A ne comportant pas la région comprise entre les acides aminés 100 à 364 donne deux types de réponses lors d'un essai GAL4 : ce mutant inhibe la transcription lorsque sa concentration est faible mais active la transcription lorsque sa concentration est forte (Cludts and Farrell, 1998). La protéine EBNA-3A possède donc une fonction activatrice de la transcription qui est masquée lorsque la protéine est entière. De plus, et toujours grâce au système GAL4, un domaine activateur de la transcription a été identifié pour la protéine EBNA-3A entre les acides aminés 627 et 805 (**Fig 4A**) (Dalbiès-Tran et al., 2001). Pour l'instant, aucune étude n'a été effectuée sur l'effet transcriptionnel de la protéine EBNA-3B.

Ces différents travaux indiquent que les protéines EBNA3 (au moins EBNA-3A et -3C) jouent un rôle dans la régulation transcriptionnelle. Cependant, ces protéines ne semblent pas se fixer directement à l'ADN (Sample and Parker, 1994), suggérant qu'elles sont recrutées sur l'ADN par l'intermédiaire de protéines adaptatrices. Le premier facteur de fixation à l'ADN connu pour interagir avec les trois protéines EBNA3 est RBP-Jκ.

II. 1. 2. Les EBNA3 et la protéine RBP-Jκ

La protéine RBP-Jκ joue un rôle de facteur de transcription dans la voie Notch (Voir introduction générale §III. 1. 1. 1. 3.) et est impliquée dans la régulation des gènes de latence d'EBV. En effet, la protéine virale EBNA2, nécessaire à l'initiation ainsi qu'au maintien de l'immortalisation des cellules B, est un facteur de transcription qui régule positivement l'expression de tous les gènes viraux, exprimés en latence III, via les promoteurs Cp et LMPp. Cependant, EBNA2 qui n'interagit pas directement avec l'ADN, est recrutée sur ses promoteurs cibles par la protéine cellulaire RBP-Jκ (**Fig 5A**). Contrairement à l'interaction observée entre EBNA2, RBP-Jκ et l'ADN, il a été montré, *in vitro*, que les complexes RBP-Jκ/EBNA-3A, RBP-Jκ/EBNA-3B et RBP-Jκ/EBNA-3C ne sont pas stables sur l'ADN (Waltzer et al., 1994, 1996; Robertson et al., 1995, 1996; Zhao et al., 1996). L'expression d'un gène cible placé sous le contrôle d'un promoteur artificiel portant des sites de fixation pour RBP-Jκ peut être activé soit par EBNA2, soit par une protéine de fusion entre RBP-Jκ et le domaine d'activation de la transcription de la protéine VP16 (**Fig 5A**) (Waltzer et al., 1996). En présence d'EBNA-3A ou -3C, cette expression est réprimée (**Fig 5B**). Il a de plus été montré qu'EBNA2 et EBNA-3C interagissent de façon exclusive avec RBP-Jκ (Johannsen

et al., 1996) : en effet, il ne semble pas y avoir formation d'un complexe ternaire RBP-J κ /EBNA2/EBNA-3C. Enfin, Johannsen et ses collaborateurs ont montré que dans les lymphocytes B immortalisés par EBV la plupart des protéines EBNA2 et au moins 20 % des protéines EBNA-3C interagissent avec RBP-J κ (Johannsen et al., 1996). Ainsi, les EBNA3 pourraient avoir un rôle antagoniste à EBNA2 dans la régulation de l'expression de certains gènes viraux et probablement cellulaires.

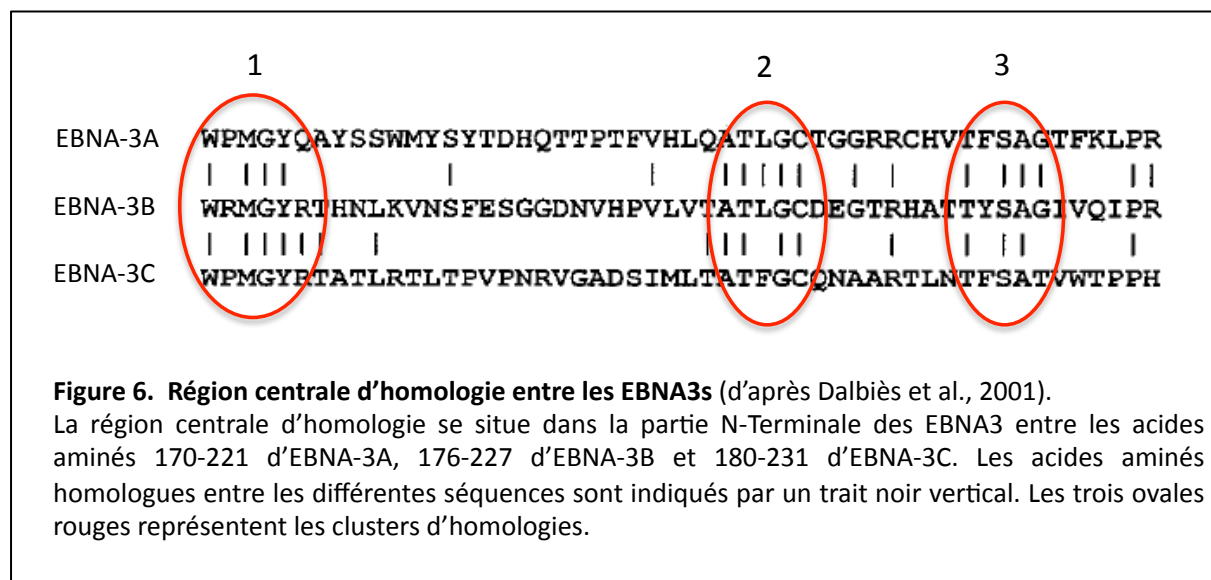


La protéine RBP-J κ interagit avec les trois protéines EBNA3 au niveau de leur domaine N-Terminal (Robertson et al., 1996; Zhao et al., 1996; Cludts and Farrell, 1998; West et al., 2004; Maruo et al., 2005; Lee et al., 2009; Calderwood et al., 2011). Cette région est conservée entre les EBNA3, en particulier entre les acides aminés 90 et 310 (par rapport à EBNA-3A) et est connue sous le nom de région d'homologie. Cependant, certains résultats quant à la région exacte d'interaction avec RBP-J κ sont contradictoires. En effet, grâce à des expériences de GST-pull down *in vitro*, Robertson et ses collaborateurs (Robertson et al.,

1996) ont montré que les domaines compris entre les acides aminés 1 à 138 d'EBNA-3A, 1 à 311 d'EBNA-3B et 1 à 183 d'EBNA-3C sont suffisants à l'interaction avec RBP-Jk. Cependant d'autres études remettent en cause ces résultats. En effet, et toujours par GST-pull down la région d'EBNA-3A comprise entre les acides aminés 1 à 223 (Zhao et al., 1996) est suffisante pour interagir avec RBP-Jk alors que les résidus 1 à 172 ne suffisent plus. Les résultats de Zhao et ses collègues sont confortés par ceux de Bourillot et ses collaborateurs (Bourillot et al., 1998) qui montrent, par deux-hybrides *in vivo*, que la région située entre les acides aminés 1 à 234 interagit avec RBP-Jk mais pas la région comprise entre les acides aminés 1 à 172. Cludts et Farrell quant à eux, toujours par des expériences de GST-pull down *in vitro*, ont trouvé deux régions d'interactions pour RBP-Jk dans la protéine EBNA-3A (Cludts and Farrell, 1998). En effet, la région comprise entre les acides aminés 1 à 224 ainsi que la région 224-566 interagissent très fortement et indépendamment avec RBP-Jk. Cependant, il est à noter que cette région 224-566, identifiée *in vitro*, n'interagit pas avec la protéine RBP-Jk dans l'étude de Dalbiès et ses collaborateurs (expériences de deux-hybrides *in vivo*) (Dalbiès-Tran et al., 2001). Les résultats sont aussi contradictoires pour la protéine EBNA-3C, dont la région d'interaction 1-183 identifiée *in vitro* par l'équipe de Robertson ne suffit pas pour interagir avec RBP-Jk selon les résultats de Zhao et ses collègues (Zhao et al., 1996) : la région minimum d'interaction serait entre les acides aminés 1 à 240 (toujours par des expériences *in vitro*).

Même si certaines études sont contradictoires, la plupart des données présentes dans la littérature s'accorde à dire que la région importante des EBNA3 pour l'interaction avec RBP-Jk se situe dans la région centrale d'homologie située entre les acides aminés 170-221 d'EBNA-3A, 176-227 d'EBNA-3B et 180-231 d'EBNA-3C (**Fig 6**) (Bourillot et al., 1998; Dalbiès-Tran et al., 2001; Maruo et al., 2005, 2009; Lee et al., 2009; Calderwood et al., 2011). En effet, les protéines EBNA-3A et -3C dépourvues de ces régions n'interagissent plus avec RBP-Jk et ne permettent plus d'inhiber l'activation de la transcription par EBNA2 (Maruo et al., 2005, 2009). Cependant il est important de noter que des mutations dans les environs de cette région centrale d'homologie peuvent affecter l'interaction des protéines EBNA3 avec RBP-Jk (West et al., 2004; Maruo et al., 2005). L'alignement des séquences de la région centrale d'homologie a permis de mettre en évidence que trois clusters d'acides aminés sont conservés entre les trois protéines EBNA3 (**Fig 6**). La mutation de ces clusters dans la protéine EBNA-3A a permis de montrer que la région ATLCG (cluster 2) est importante pour

le rôle de répression de la transcription d'EBNA-3A (Dalbiès-Tran et al., 2001). En effet, une protéine EBNA-3A mutée dans cette région (ATLGC en AAAGA) n'inhibe plus l'activation de la transcription induite par EBNA2. Les auteurs ont ensuite effectué un essai deux-hybrides en mammifère dans lequel ils ont utilisé la région 125 à 222 d'EBNA-3A sauvage ou mutée, fusionnée au domaine de fixation de GAL4, ainsi qu'un plasmide d'expression pour la protéine RBP-Jκ-VP16. Alors que la région 125 à 222 d'EBNA-3A est capable de recruter la protéine RBP-Jκ-VP16 et d'activer le plasmide rapporteur, le mutant de la région ATLGC n'a pas d'effet sur le gène rapporteur. Cette région ATLGC est donc importante pour l'interaction avec RBP-Jκ. Cependant, et de manière surprenante, la protéine EBNA-3A entière mutée pour la région ATLGC interagit toujours, par co-immunoprécipitation *in vivo*, avec RBP-Jκ (Dalbiès-Tran et al., 2001; Maruo et al., 2005). La mutation de la région homologue dans la protéine EBNA-3C (ATFGC en AAAAA) bloque aussi son rôle d'inhibiteur de la transcription induite par EBNA2, mais interagit toujours avec RBP-Jκ. (Maruo et al., 2009). Cependant, il est à noter que ces mutations en alanines de la région conservée entre les EBNA3, même si elles n'abolissent pas l'interaction avec RBP-Jκ, diminuent cette interaction. Quelques études suggèrent que cette interaction résiduelle serait due à des régions en dehors de la région centrale d'homologie qui pourrait stabiliser l'interaction entre les EBNA3 et RBP-Jκ (Cludts and Farrell, 1998; Dalbiès-Tran et al., 2001).



L'interaction entre RBP-Jκ et EBNA-3A/-3C est donc importante pour la régulation des propriétés transactivatrices de la protéine virale EBNA2. De plus, cette interaction semble

aussi être très importante pour la prolifération des LCL. En effet alors que l'expression d'une protéine EBNA-3A sauvage transcomplémente l'inactivation d'une protéine EBNA-3AHT conditionnelle pour la prolifération des LCL, une protéine EBNA-3A dépourvue du domaine d'interaction avec RBP-Jκ ne permet pas aux cellules de proliférer (Maruo et al., 2005). Ce mutant n'interagit plus avec la protéine RBP-Jκ en co-immunoprécipitation *in vivo* et ne permet plus d'inhiber l'activation de la transcription par EBNA2. De manière intéressante, le même résultat a été trouvé pour la protéine EBNA-3C (Lee et al., 2009; Maruo et al., 2009). Tous les mutants d'EBNA-3A ou EBNA-3C ne permettant plus d'inhiber l'activation de la transcription par EBNA-2 ne sont plus capables de transcomplémenter les LCL. Il semble donc que l'interaction des protéines EBNA3 avec RBP-Jκ joue un rôle essentiel dans le maintien de la prolifération cellulaire.

La protéine RBP-Jκ est un facteur de transcription composé de trois domaines : un domaine N-Terminal (NTD), un domaine C-Terminal (CTD) et un domaine central (appelé BTD pour Beta Trefoil Domain) composé d'une triple répétition d'un feuillet beta à quatre brin (Kovall and Hendrickson, 2004). Il a été montré que les domaines NTD et BTD coopèrent pour l'interaction avec l'ADN et que les protéines EBNA3 interagissent avec ces deux domaines (Krauer et al., 1996; Zhao et al., 1996; Calderwood et al., 2011). Récemment, Calderwood et ses collègues ont montré que seule l'interaction avec le domaine NTD était essentielle à la prolifération des LCL. En effet, une protéine EBNA-3C mutée dans son domaine central d'homologie (ATFGC en AAAAA) interagit toujours avec le domaine BTD (Calderwood et al., 2011) et la protéine RBP-Jκ entière (Lee et al., 2009; Maruo et al., 2009) mais n'interagit plus avec le domaine NTD (Calderwood et al., 2011). De plus, ce mutant ne permet plus la transcomplémentation de l'inactivation d'une protéine EBNA-3CHT conditionnelle pour la prolifération des LCL (Calderwood et al., 2011). Ce résultat est donc consistant avec le modèle selon lequel les EBNA3 interagissent avec RBP-Jκ par leur domaine central d'homologie mais interagissent aussi avec d'autres régions de RBP-Jκ par d'autres domaines. De plus, le domaine NTD de RBP-Jκ étant impliqué dans l'interaction avec le grand sillon de l'ADN (Kovall and Hendrickson, 2004), il est suggéré que c'est en interagissant avec ce domaine que les EBNA3 pourraient déstabiliser la fixation de RBP-Jκ à l'ADN.

II. 1. 3. Les promoteurs viraux cibles des EBNA3

Les promoteurs les plus étudiés sur lesquels un effet des EBNA3 a pu être observé sont les promoteurs viraux LMP1/LMP2Bp et Cp (ces promoteurs contiennent des sites de fixation pour RBP-Jκ). Le promoteur LMP1/LMP2Bp est un promoteur bidirectionnel qui permet de réguler l'expression du gène LMP1 ainsi que du gène LMP2B dans le sens opposé. Comme le promoteur Cp, le promoteur LMP1/LMP2Bp dépend d'EBNA2 pour son activation. Pour ce qui est de l'effet d'EBNA-3C sur ce promoteur, cloné en amont d'un gène rapporteur, les résultats sont contradictoires. Il a en effet été d'abord suggéré que la protéine EBNA-3C inhibe l'activation du promoteur LMP1/LMP2Bp par EBNA2 (Robertson et al., 1995). Cependant, d'autres études trouvent au contraire que la protéine EBNA-3C active seule ou en coopération avec EBNA2 le promoteur LMP1/LMP2Bp (Marshall and Sample, 1995; Lin et al., 2002). Marshall et Sample ont montré que le double effet que pouvait avoir la protéine EBNA-3C sur le promoteur LMP1/LMP2Bp dépendait du type cellulaire ainsi que de la phase de croissance des cellules (Marshall and Sample, 1995). Alors que l'inhibition de l'activation de ce promoteur par EBNA-3C est dépendante de RBP-Jκ, il a été montré que l'activation par EBNA-3C ne dépend pas de ce facteur cellulaire (Marshall and Sample, 1995; Zhao and Sample, 2000; Lin et al., 2002). En effet, une protéine EBNA-3C mutée n'interagissant plus avec RBP-Jκ est toujours capable d'activer le promoteur LMP1/LMP2Bp avec la même efficacité qu'une protéine EBNA-3C sauvage (Zhao and Sample, 2000). Par ailleurs, il est apparu que l'activation du promoteur LMP1/LMP2Bp par EBNA2 ne dépend pas que du facteur RBP-Jκ, mais également des facteurs Spi-1/PU.1 et Spi-B (Laux et al., 1994a; Johannsen et al., 1995; Sjöblom et al., 1995a). En effet, Zhao et ses collègues ont montré que les sites de fixation pour Spi-1/PU.1 et Spi-B sur le promoteur LMP1/LMP2Bp sont requis pour l'activation de la transcription par EBNA-3C (Zhao and Sample, 2000). De plus, comme EBNA2, la protéine EBNA-3C est capable, *in vitro*, d'interagir avec les facteurs de transcription Spi-1/PU.1 et Spi-B (Zhao and Sample, 2000). Enfin, Lin et ses collègues ont montré que le domaine initialement identifié comme étant le domaine répresseur de la protéine EBNA-3C (acides aminés 365-545) est nécessaire et suffisant pour la co-activation du promoteur LMP1/LMP2Bp avec EBNA2 (Lin et al., 2002). Les deux autres protéines EBNA3, EBNA-3A et -3B, sont aussi capables d'inhiber l'activation par EBNA2 du promoteur LMP1/LMP2Bp (Zhao and Sample, 2000) et de co-activer ce promoteur avec EBNA2, bien que moins efficacement que la protéine EBNA-3C (Lin et al., 2002).

La régulation précise du promoteur LMP1/LMP2Bp est très importante puisque d'une part le niveau de la protéine LMP1 est critique pour l'activation des lymphocytes B, l'adhésion, la sécrétion de facteur de croissance autocrine, ainsi que leur survie, et puisque d'autre part un niveau excessif de LMP1 peut être toxique (Wang et al., 1988c; Hammerschmidt et al., 1989; Kaykas and Sugden, 2000; Sandberg et al., 2000). La lignée de cellules Raji (lignée de cellules établie à partir d'un lymphome de Burkitt) a la particularité de porter un génome EBV amputé du gène codant pour EBNA-3C. Dans ces cellules, le niveau de la protéine LMP1 chute lorsque les cellules sont à hautes densités, arrêtées en phase G₁. Cependant, lorsque EBNA-3C est exprimée à nouveau dans ces cellules Raji le niveau de LMP1 est non seulement augmenté dans les cellules en prolifération mais aussi lorsque les cellules sont à hautes densités (Allday et al., 1993; Allday and Farrell, 1994). Ces résultats sont confortés par l'étude de Jiménez-Ramírez et ses collègues qui utilisent une lignée de cellules Raji dans laquelle l'expression de la protéine EBNA-3C est inductible. En présence d'EBNA-3C l'expression de LMP1 et LMP2B est induite (Jiménez-Ramírez et al., 2006). Le rôle d'EBNA-3C dans l'activation du promoteur LMP1/LMP2Bp est de plus conforté par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrant un recrutement *in vivo* d'EBNA-3C sur ce promoteur (Jiménez-Ramírez et al., 2006).

Le promoteur Cp quant à lui est un promoteur essentiel dans le génome d'EBV car c'est à partir de ce dernier que va être initié, par la protéine virale EBNA2, la transcription des gènes codant pour toutes les protéines EBNA. Lorsque ce promoteur est cloné en amont d'un gène rapporteur (CAT ou LUC), les EBNA3 répriment l'activation par EBNA2 de la transcription au promoteur Cp (Radkov et al., 1997; Cludts and Farrell, 1998). Le domaine répresseur d'EBNA-3C (situé entre les acides aminés 280 et 525) ainsi que le domaine d'interaction avec RBP-Jκ sont nécessaires à cette répression. De manière intéressante, la répression exercée par EBNA-3C n'est pas observée dans tous les types cellulaires suggérant que l'activité répressive d'EBNA-3C dépend de la présence d'un co-répresseur spécifique de cellules (Radkov et al., 1997). Ces expériences, utilisant des systèmes rapporteurs et des expressions transitoires, suggèrent que la protéine EBNA-3C peut être recrutée par RBP-Jκ (ou un autre facteur encore inconnu) sur l'ADN et réprimer l'activation du promoteur Cp en recrutant des co-répresseurs. Cependant, en ce qui concerne l'effet *in vivo* des protéines EBNA3 sur les promoteurs viraux, dans le contexte du génome viral, les résultats publiés sont contradictoires. Ainsi, après avoir établi des lignées de cellules lymphoblastoïdes infectées avec un EBV recombinant dont la fonction des protéines EBNA-3A ou -3C est inductible par

les estrogènes, Maruo et ses collaborateurs (Maruo et al., 2003, 2006) ont montré qu'en absence d'une des deux protéines (EBNA-3A ou -3C) fonctionnelles, les cellules sont bloquées en phase G₁ et meurent par apoptose. Dans ces expériences, le niveau d'expression des autres protéines virales latentes, produites à partir du promoteur Cp ou LMP1/LMP2Bp, n'est pas modifié. Par ailleurs, dans les différentes études utilisant les lignées de cellules Raji, nous venons de voir que l'expression de la protéine EBNA-3C active l'expression au promoteur LMP1/LMP2B. Cependant, dans ces expériences, le niveau d'expression des autres protéines de latences (promoteur Cp) ne change pas en présence ou en absence d'EBNA-3C (Allday and Farrell, 1994; Jiménez-Ramírez et al., 2006).

Ces différentes expériences suggèreraient que les protéines EBNA-3A et -3C ne sont pas impliquées, *in vivo*, dans la régulation du promoteur Cp dans des cellules immortalisées par EBV. On peut donc penser que l'inhibition par les EBNA3 de l'activation par EBNA2 du promoteur Cp pourrait être importante au début de l'immortalisation des cellules B au moment du passage entre les promoteurs Wp et Cp. En ce qui concerne la régulation du promoteur LMP1/LMP2Bp, les résultats sont contradictoires selon les lignées cellulaires utilisées.

II. 1. 4. Les mécanismes d'action des EBNA3

Bien que les mécanismes d'action des EBNA3 soient encore mal compris, il y a dans la littérature des informations sur les mécanismes potentiels d'activation et de répression par les EBNA3. Malheureusement la plupart des études n'ont été effectuées que sur la protéine EBNA-3C.

Un des mécanismes important pour la régulation de la transcription est l'état d'acétylation des histones. En effet l'acétylation des lysines atténue la charge positive des histones provoquant ainsi une baisse de leur affinité pour l'ADN. Cette déstabilisation du nucléosome permet une accessibilité plus grande de l'ADN aux facteurs généraux de transcription. De manière intéressante, il a été montré que la protéine EBNA-3C interagit de manière directe avec l'histone acétyltransférase (HAT) p300 (Cotter and Robertson, 2000; Subramanian et al., 2002). Cette interaction entre EBNA-3C et l'acétyltransférase p300 a été associée à l'activation de la transcription (Rosendorff et al., 2004). Pour démontrer cela, Rosendorff et ses collègues ont utilisé un système rapporteur comprenant le gène de la

luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant plusieurs sites de liaison à l'ADN de la protéine E2 du papillomavirus. Alors que l'expression dans des cellules BJAB (cellules B-EBV négatives) d'une protéine p300 en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de E2 active cette construction, l'expression de la protéine EBNA-3C est capable de co-activer la transcription avec E2-p300 (Rosendorff et al., 2004).

Par ailleurs, EBNA-3C interagit également avec la prothymosine alpha (Prot α) (Cotter and Robertson, 2000). Cette protéine, très importante pour la division et la prolifération cellulaire, interagit avec les histones et est à l'origine d'une décondensation de la chromatine (Díaz-Jullien et al., 1996; Gomez-Marquez and Rodríguez, 1998; Cotter and Robertson, 2000). De plus, Prot α interagit avec la protéine p300 et cette interaction résulte en une activation de la transcription d'un plasmide rapporteur dans des cellules HEK293 (cellules rénales embryonnaires humaines) (Cotter and Robertson, 2000; Subramanian et al., 2002). Subramanian et ses collaborateurs ont en effet montré que, d'une part, la protéine de fusion Prot α -GAL4 est capable seule d'activer la transcription d'une construction contenant des sites de fixation de GAL4 en amont de la luciférase et d'autre part, que cette activation est augmentée en présence de la protéine p300. Dans ce système, l'expression d'EBNA-3C régule négativement cette activation de la transcription et inhibe donc l'activité HAT associée au complexe Prot α – p300 (Subramanian et al., 2002). Bien que le mécanisme exact de cette régulation de l'activité HAT par EBNA-3C ne soit pas complètement élucidé, il a été montré que la protéine EBNA-3C peut être retrouvée dans un complexe contenant la Prot α et p300 et qu'EBNA-3C peut faire la compétition avec Prot α pour l'interaction avec p300 (Cotter and Robertson, 2000; Subramanian et al., 2002).

La protéine EBNA-3C est aussi capable d'interagir avec des histones déacétylases (HDAC), protéines associées à une répression de l'activité transcriptionnelle. En effet, il a été montré qu'EBNA-3C interagit avec les protéines HDAC 1 et HDAC 2 et est retrouvée dans un complexe comprenant les HDAC, la Prot α , ainsi que les co-répresseurs mSin3A et NCoR (Radkov et al., 1999; Knight et al., 2003).

De manière intéressante, un nouveau mécanisme de répression par les protéines EBNA3 a récemment été découvert. En effet, il a été montré que les protéines EBNA-3A et EBNA-3C sont capables de recruter le complexe répresseur polycomb 2 (PRC2) (Paschos et al., 2012), un complexe multiprotéique impliquée dans la répression de la transcription. Ce mécanisme sera expliqué plus en détails dans le § II. 2. 2. 2.

Les protéines EBNA-3A et -3C mais pas EBNA-3B interagissent avec le co-répresseur CtBP1 (Touitou et al., 2001; Hickabottom et al., 2002). CtBP1 (E1A C-Terminal binding protein 1) a été initialement identifiée comme un facteur interagissant avec le domaine C-Terminal de l'oncoprotéine E1A de l'adénovirus (Boyd et al., 1993). Même s'il a été rapporté que la protéine CtBP1 peut recruter les protéines HDAC 1 (Sundqvist et al., 1998) et Sin3A (Koipally and Georgopoulos, 2000), le mécanisme précis par lequel CtBP1 inhibe la transcription n'est toujours pas compris. Cependant, il est connu que les facteurs de transcription pouvant se lier à CtBP1, dont la protéine E1A, contiennent tous un motif conservé d'interaction avec CtBP1, le motif Pro-X-Asp-Leu-Ser (PXDLS). Un motif extrêmement similaire au motif conservé PXDLS, le motif PLDLS, a été identifié dans la partie C-Terminale d'EBNA-3C par Touitou et ses collègues. Ce motif est essentiel et suffisant à l'interaction d'EBNA-3C avec la protéine CtBP1 (Touitou et al., 2001). La protéine EBNA-3A quant à elle, interagit avec CtBP1 par l'intermédiaire de deux motifs, le motifs ALDLS et VLDLS, situés dans la partie C-Terminale d'EBNA-3A (Hickabottom et al., 2002). Ces deux motifs sont importants pour l'interaction et seule une protéine EBNA-3A mutée sur ces deux motifs n'interagit plus avec CtBP1. Les protéines EBNA-3A et -3C sont connues pour être des répresseurs de la transcription lorsque ces dernières sont exprimées en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 (GAL4 DBD). Il a été montré que cet effet répresseur est dépendant de l'interaction avec CtBP1 pour la protéine EBNA-3A (Hickabottom et al., 2002). En effet, une protéine EBNA-3A-GAL4 DBD mutée pour ses deux motifs d'interaction avec CtBP1 n'est plus capable d'inhiber la transcription. A l'opposé, l'utilisation d'une protéine EBNA-3C-GAL4 DBD n'interagissant plus avec CtBP1 inhibe la transcription de manière quasi identique à la protéine EBNA-3C sauvage, indiquant que CtBP1 n'a qu'une petite contribution dans la répression de la transcription par EBNA-3C (Touitou et al., 2001). Il a enfin été montré que l'interaction d'EBNA-3A et -3C avec CtBP1 est très importante pour leur capacité à transformer des fibroblastes de rongeurs en coopération avec Ha-Ras (Touitou et al., 2001; Hickabottom et al., 2002). L'interaction des EBNA3 avec le répresseur CtBP1 semble donc importante pour leur fonction.

EBNA-3C interagit avec les protéines SUMO-1 et SUMO-3 (Lin et al., 2002; Rosendorff et al., 2004). Contrairement à la poly-ubiquitination qui généralement entraîne une dégradation des protéines ciblées par le protéasome, la sumoylation (aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO) affecte les propriétés biochimiques des protéines ciblées comme leur capacité à interagir avec d'autres protéines ou avec l'ADN, leur

localisation cellulaire, ou encore leur activité transcriptionnelle (Yeh et al., 2000; Müller et al., 2001; David et al., 2002). Rosendorff et ses collaborateurs ont montré que l'interaction d'EBNA-3C avec les protéines SUMO est indispensable à la co-activation du promoteur LMP1/LMP2Ap avec EBNA2 (Rosendorff et al., 2004). Le mécanisme exact de cette co-activation n'est pas encore clair, mais il a été montré qu'EBNA-3C est capable de potentialiser l'activation de la transcription d'une protéine p300 fusionnée à un domaine hétérologue de fixation à l'ADN, alors qu'une protéine EBNA-3C mutée pour son interaction avec les protéines SUMO ne le peut plus. L'activation du promoteur LMP1/LMP2Bp par EBNA2 passant par le recrutement de p300, il est supposé qu'EBNA-3C co-active la transcription avec EBNA2 en interagissant avec une protéine sumoylée jouant normalement un rôle de répresseur de la transcription (Rosendorff et al., 2004).

Enfin, la protéine EBNA-3C est capable d'interagir *in vitro* avec la protéine TBP (Tata Binding Protein) (Bain et al., 1996), facteur essentiel à l'initiation de la transcription (Timmers et al., 1992). Cette interaction pourrait être importante pour la fonction d'EBNA-3C dans la transcription, mais aucune donnée expérimentale ne permet encore de valider cette théorie.

Même si les mécanismes exacts mis en jeu lors de la régulation de la transcription par les EBNA3 ne sont pas encore complètement élucidés, il semble que leurs interactions avec les HDAC et HAT jouent un rôle important. Nous venons de voir que les protéines EBNA3 jouent un rôle dans la régulation des promoteurs viraux. De manière intéressante, les EBNA3 semblent aussi jouer un rôle dans la régulation de gènes cellulaires.

II. 2. Les protéines EBNA3 et la transcription de promoteurs cellulaires

Un rôle des protéines EBNA3 dans la transcription de gènes cellulaires a initialement été suggéré par les changements d'expression de certains gènes après l'expression des EBNA3. En effet, il a notamment été montré que la protéine EBNA-3C, exprimée stablement après transfection dans des cellules de lymphome de Burkitt EBV-négative (BJAB), induit l'augmentation de l'expression de l'antigène CD21, récepteur du virus d'Epstein-Barr (Wang et al., 1990a). L'expression de la protéine EBNA-3C dans des cellules Raji entraîne l'augmentation du récepteur CD23 ainsi que de la Vimentine (Allday et al., 1993). De plus,

l'expression de la protéine EBNA-3B dans des cellules DG75 (issue d'un lymphome de Burkitt EBV négatif) induit l'augmentation de l'antigène CD40 ainsi que de la Vimentine (Silins and Sculley, 1994). Enfin, l'expression des trois protéines EBNA3 dans les cellules DG75 induit la sur-expression de la Pleckstrine (Kienzle et al., 1996).

Un rôle des protéines EBNA3 dans la régulation de ces différents gènes cellulaires a donc été suggéré. Cependant, ces résultats ne permettent pas de savoir si les EBNA3 ont un rôle direct ou non. Il a notamment été montré par Radkov et ses collaborateurs que la protéine EBNA-3C, contrairement à la protéine EBNA2, n'a aucun effet sur un plasmide rapporteur contenant le promoteur du gène CD21 (Radkov et al., 1997). L'effet observé sur l'expression de CD21 dans les cellules BJAB est donc probablement dû à un effet indirect d'EBNA-3C. De plus, des cellules Raji exprimant stablement la protéine EBNA-3C ne montrent pas d'augmentation de l'expression du CD21 (Allday et al., 1993).

Grâce au développement des techniques à haut débit permettant d'analyser le transcriptome d'une cellule, un certain nombre de laboratoires se sont intéressés à l'impact des protéines EBNA-3 sur l'expression de l'ensemble des gènes cellulaires.

II. 2. 1. Etudes transcriptomiques à grand échelle

Afin d'identifier les gènes cellulaires régulés par EBNA-3A, -3B et -3C un grand nombre d'analyse transcriptionnelle à grande échelle a été réalisé en utilisant différents types cellulaires. Ainsi, dans le but d'identifier les gènes cellulaires régulés par EBNA-3B et EBNA-3C, Chen et ses collègues ont étudié le profil transcriptionnel d'une LCL infectée par un génome d'EBV mutant, dépourvu des séquences codantes pour EBNA-3B et dont l'expression d'EBNA-3C est fortement diminuée (Chen et al., 2006). Cette lignée, appelée LCL 3B⁻/3C^{low}, se développe plus lentement que des LCL sauvages. Le profil transcriptionnel de ces LCL 3B⁻/3C^{low} par rapport à des LCL sauvages révèle que 16 gènes sont exprimés différemment de manière significative. De plus, par RT-PCR quantitative, la comparaison de l'expression de ces 16 gènes cellulaires dans les LCL 3B⁻/3C^{low} par rapport à une lignée de LCL n'exprimant plus EBNA-3B mais exprimant EBNA-3C à un niveau normal a permis d'identifier trois gènes spécifiquement réprimés par EBNA-3B, trois par EBNA-3C et deux potentiellement activés par EBNA-3C. Parmi les gènes activés par EBNA-3C se trouve le gène codant la protéine TCL1 (T-cell leukemia/lymphoma 1A). La protéine TCL1 est connue pour ses propriétés oncogéniques et est sur-exprimée dans différents lymphomes B et T

(Pekarsky et al., 2001; Said et al., 2001). De manière intéressante, Lee et ses collaborateurs ont montré, en utilisant une lignée de LCL dont la fonction d'EBNA-3C est inducible, que la protéine EBNA-3C est bien responsable de l'activation du gène codant pour TCL1 et que cette activation passe par l'interaction d'EBNA-3C avec RBP-Jk (Lee et al., 2009). Cette lignée de LCL, dont la fonction d'EBNA-3C est inducible, a aussi été utilisée afin de déterminer les gènes cibles d'EBNA-3C (Zhao et al., 2010) et a permis d'identifier 550 gènes régulés positivement ou négativement par EBNA-3C. Un grand nombre de ces gènes est aussi régulé par EBNA-3A et codent pour des protéines de la voie de signalisation MAP Kinase, des récepteurs aux cytokines, des chémokines ou encore des protéines de la voie de signalisation JAK-STAT. Cette étude à grande échelle a aussi permis de découvrir que la protéine EBNA-3C régule positivement la chemokine CXCL12 et son récepteur CXCR4. Cette sur-expression est dépendante de l'interaction d'EBNA-3C avec RBP-Jk et permet d'augmenter le potentiel migratoire des LCL (Zhao et al., 2010). Le récepteur CXCR4 jouant un rôle dans la migration des lymphocytes B (D'Apuzzo et al., 1997), Zhao et ses collègues ont testé l'effet d'EBNA-3C sur la migration des LCL: grâce à un test de migration cellulaire en réponse à la chémokine CXCL12, ils ont montré que les LCL exprimant la protéine EBNA-3C ont un potentiel de migration plus élevé que des LCL n'exprimant plus EBNA-3C.

La première analyse transcriptionnelle destinée à identifier les gènes cibles d'EBNA-3A a été réalisée en 2007. Young et ses collaborateurs ont analysé le transcriptome de fibroblastes humains exprimant ou non la protéine EBNA-3A de manière constitutive (Young et al., 2008). Cette étude a montré que dans ce modèle, EBNA-3A est capable d'induire essentiellement l'expression de gènes codant pour des protéines chaperonnes. Cette activité est de plus spécifique à EBNA-3A. Afin d'identifier les gènes cibles de la protéine EBNA-3A dans les LCL, Hertle et ses collègues ont utilisé des lignées de cellules B infectées et immortalisées par un virus recombinant n'exprimant plus la protéine EBNA-3A. Ces LCL Δ 3A ont une prolifération moins intense que des LCL sauvages et montrent un haut niveau de mort par apoptose (Hertle et al., 2009). Le profil d'expression de ces LCL déficientes en protéine EBNA-3A par rapport à des LCL sauvages montre une sous-régulation de 129 gènes et une sur-expression de 167 gènes, dont la plupart sont impliqués dans les processus d'apoptose et dans la progression du cycle cellulaire.

Enfin, une analyse transcriptionnelle a aussi été effectuée sur des cellules de lymphome de Burkitt (BL31) EBV négative infectées par une série de virus recombinants pour chacun des EBNA3, ainsi qu'un virus dont le génome est dépourvu de la totalité des

EBNA3 (White et al., 2010). Cette étude a identifié environ 1000 gènes dont la régulation par EBV requiert au moins l'une des protéines EBNA3. Un tiers de ces gènes identifiés nécessite plus d'une protéine EBNA3 pour leur régulation, principalement EBNA-3C coopérant avec soit EBNA-3A, soit EBNA-3B, soit les deux. Ainsi, ces résultats montrent que les EBNA3 sont capables de coopérer. Il a notamment été montré que les protéines EBNA-3A et EBNA-3C, dans les cellules issues de lymphome de Burkitt, coopèrent pour l'inhibition de l'expression du gène codant pour une protéine pro-apoptotique membre de la famille BCL-2, la protéine BIM (Anderton et al., 2007; Paschos et al., 2009). Cette répression de la transcription est associée à une augmentation de la méthylation du promoteur du gène codant la protéine BIM (Paschos et al., 2009) et sera expliqué plus en détails dans le §II. 2. 2. 2. Afin d'évaluer la pertinence d'une étude dans des BL, les auteurs ont comparé le transcriptome des lignées BL31Δ3A et Δ3B avec les lignées LCLΔ3A et Δ3B (White et al., 2010). Environ un tiers des gènes dont l'expression dans les LCL est altérée en absence de la protéine EBNA-3B est retrouvé aussi modifié dans les BL31-Δ3B. Cependant, très peu de gènes régulés par EBNA-3A ont été retrouvés en commun entre les BL31 et les LCL.

Récemment, McClellan et ses collègues ont réalisé le profil transcriptionnel de cellules BJAB (cellules issues d'un lymphome de Burkitt EBV négatif) exprimant stablement EBNA-3C et ont identifié comme gènes cibles d'EBNA-3C des gènes impliqués dans les voies de signalisation du récepteur aux intégrines, ainsi que certaines chimiokines (McClellan et al., 2012). De plus, par des expériences de ChIP, cette étude a montré que la répression par EBNA-3C s'accompagne d'une baisse de l'acétylation de l'histone H3 (H3K9/14) ainsi que de l'augmentation de la triméthylation de l'histone H3 (H3K27me3).

L'ensemble de ces données montre la complexité de l'interaction entre le virus d'Epstein-Barr et sa cellule hôte, au sein de laquelle les trois protéines EBNA-3 coopèrent pour moduler le devenir de la cellule.

II. 2. 2. Répression épigénétique et coopération entre les protéines EBNA-3A et EBNA-3C

Les régulations épigénétiques menant à la répression de la transcription sont souvent associées à la méthylation de résidus cytosines des îlots CpG se situant au niveau des promoteurs (Berger et al., 2009). Cependant les mécanismes de répression impliquent aussi des modifications post-traductionnelles des protéines histones. Un des complexes protéiques

les plus étudié dans la répression génique est le complexe répresseur polycomb 2 (PRC2). Ce complexe multiprotéique induit la répression grâce à l'activité méthyltransférase d'un de ses composants, EZH2, qui catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) (Simon and Kingston, 2009; Margueron and Reinberg, 2011). La question du recrutement des protéines polycombs sur leur gènes cibles reste encore peu élucidée, cependant il semble que les régions riches en dinucléotides CpG soient importantes (Ku et al., 2008). La triméthylation H3K27me3 peut ensuite induire la fixation d'un second complexe protéique, le complexe répresseur polycomb 1 (PRC1), permettant la compaction de la chromatine et la formation d'hétérochromatine (Grau et al., 2011).

II. 2. 2. 1. Répression du gène *CDKN2A*

Le premier gène connu pour être régulé par les protéines EBNA-3A et EBNA-3C a été le gène *CDKN2A* codant pour les protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF}, deux protéines inhibitrices du cycle cellulaire (Maruo et al., 2006, 2011; Hertle et al., 2009; Skalska et al., 2010). Cette répression de la transcription par les protéines EBNA-3A et EBNA-3C est en grande partie due à l'interaction des deux protéines virales avec le répresseur CtBP1 (Skalska et al., 2010). De plus, cette répression, réversible, est associée à des modifications épigénétiques et plus particulièrement à une augmentation de la triméthylation de l'histone H3 (H3K27). En effet, l'inactivation de la protéine EBNA-3C dans des LCL réprime la triméthylation H3K27me3 du promoteur *CDKN2A* et augmente la triméthylation H3K4me3, méthylation associée à la chromatine active (Skalska et al., 2010; Maruo et al., 2011). Cette répression du gène *CDKN2A* par les protéines virales EBNA-3A et EBNA-3C joue un rôle essentiel dans la prolifération des LCL. En effet, il a été montré que l'inhibition de l'expression des deux protéines inhibitrices du cycle cellulaire p16^{INK4A} et p14^{ARF} par shARN permet à des LCL dont la protéine EBNA-3A ou EBNA-3C est inactivée de continuer à proliférer de manière comparable à des LCL sauvages (Maruo et al., 2011). Cette étude montre ainsi que le rôle principal des protéines EBNA3 dans la prolifération des LCL est l'inhibition de l'expression des protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF}.

II. 2. 2. 2. Répression du gène *bim*

Le deuxième gène identifié comme étant régulé par une coopération entre EBNA-3A et -3C est le gène *bim* codant pour une protéine pro-apoptotique (Anderton et al., 2007). En effet, la répression de ce gène par le virus d'Epstein-Barr est associée à la triméthylation H3K27me3 du promoteur *bim* et requiert à la fois EBNA-3A et EBNA-3C (Paschos et al., 2009, 2012). Par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) au niveau du promoteur du gène *bim*, il a de plus été montré qu'EBNA-3A et -3C sont indispensables au recrutement de deux protéines du complexe PRC2, les protéines SUZ12 et EZH2 (cependant aucune interaction directe entre ces protéines n'a encore pu être mise en évidence) (Paschos et al., 2012). De plus, et toujours par des expériences de ChIP, les auteurs ont montré qu'EBNA-3A et -3C n'inhibent pas le recrutement de l'ARN polymérase II mais inhibent sa phosphorylation sur la Sérine 5, phosphorylation essentielle à l'initiation de la transcription. EBNA-3A et EBNA-3C sont donc capables, ensemble, de bloquer l'initiation des transcrits *bim*. Enfin l'étude menée par Paschos et ses collaborateurs a montré que la protéine EBNA-3C interagit avec EBNA-3A et qu'EBNA-3C est recrutée sur le promoteur du gène *bim* (Paschos et al., 2012). L'interaction des EBNA3 avec la protéine CtBP1 joue un rôle important mais n'est pas essentielle à la répression de *bim* (Paschos et al., 2012). Ces études sur le promoteur du gène *bim* suggèrent que dans les cellules B infectées par EBV la répression de *bim* est initialement associée à une répression épigénétique par la triméthylation H3K27mE suivie d'une méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG (Paschos et al., 2009).

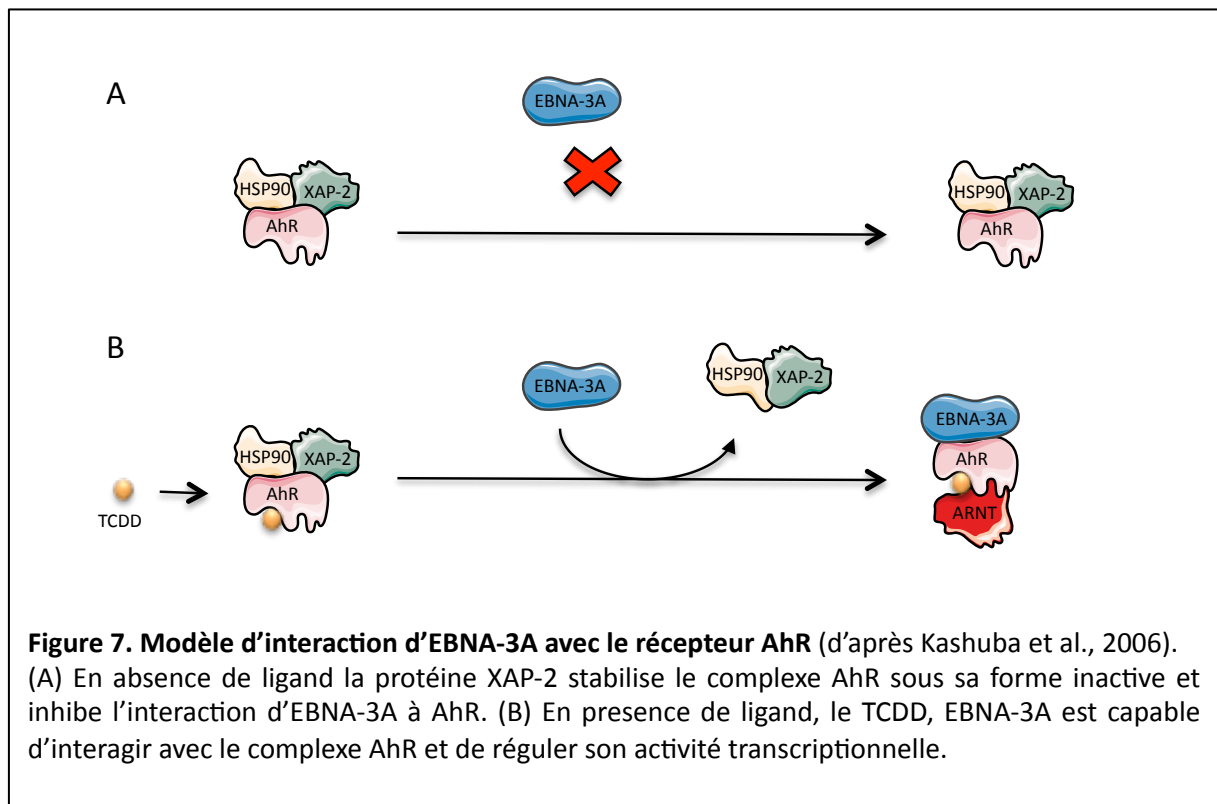
II. 2. 3. Mécanismes de Régulation de gènes cellulaires par EBNA-3A

II. 2. 3. 1. Régulation du récepteur d'hydrocarbures aromatiques AhR

Le récepteur des hydrocarbures aromatiques AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) est un facteur de transcription inductible reconnaissant plusieurs types de dioxines dont la plus connue est la TCDD (2,3,7,8-TetraChloroDibenzo-p-Dioxin) (Gu et al., 2000). En absence de ligand le récepteur est associé à la protéine chaperonne Hsp90 et à deux co-chaperonnes, les protéines p23 et XAP-2. XAP-2 est connue pour stabiliser la protéine AhR et pour participer à la régulation de la localisation cytoplasmique de ce récepteur (Kazlauskas et al., 2001). Après interaction avec un ligand, AhR s'accumule dans le noyau où elle devient active en interagissant avec le facteur ARNT. L'hétérodimère ainsi formé active la transcription de

gènes cibles portant l'élément de réponse XRE (Xenobiotic Response Element). L'activation de cette voie de signalisation dans des modèles animaux a de nombreuses conséquences toxiques incluant carcinogénèse, immunosuppression et mort (Poland and Knutson, 1982). De plus, des souris transgéniques exprimant un récepteur AhR constitutivement actif développent des tumeurs, ce qui est consistant avec la fonction oncogénique du récepteur AhR (Andersson et al., 2002).

De manière intéressante, Kashuba et ses collègues ont montré que la protéine EBNA-3A interagit à la fois avec AhR et avec la co-chaperonne XAP-2 (Kashuba et al., 2000). L'interaction avec XAP-2 relocalise cette protéine dans le noyau. La stabilité de l'interaction d'EBNA-3A avec AhR semble dépendante de la présence de XAP-2 et de la présence du ligand (Kashuba et al., 2006) (Fig 7).



En effet, en absence de ligand, XAP-2 inhibe l'interaction d'EBNA-3A au récepteur AhR, alors qu'en présence de ligand (TCDD) pour le récepteur AhR, l'interaction d'EBNA-3A avec AhR est stabilisée et la protéine XAP-2 n'a plus d'effet sur cette interaction. Par ailleurs, grâce à des essais luciférase, il a été montré qu'EBNA-3A augmente les capacités transactivatrices du récepteur AhR. Enfin, alors que le traitement par le TCDD induit une baisse de croissance des cellules B, les mêmes cellules B exprimant EBNA-3A ont une

croissance normale suggérant qu'EBNA-3A inhibe l'effet de AhR. Les auteurs suggèrent donc que EBNA-3A pourrait avoir deux effets différents sur le récepteur AhR, un effet à court terme d'activation (ce qui explique les résultats des essais luciférase) et un effet à long terme d'inhibition (expliquant les effets sur les lymphocytes B traités avec le TCDD). Cependant, le mécanisme exact de cette activation ou répression n'est pas encore connu et reste à clarifier.

II. 2. 3. 2. Régulation du récepteur à la vitamine D

Le récepteur de la vitamine D, VDR (Vitamin D Receptor), est un récepteur nucléaire formant des hétérodimères avec le récepteur X des rétinoïdes α et β et activant la transcription de gènes cibles (Norman, 2006). L'expression de ces gènes cibles inhibe la prolifération cellulaire et induit une mort des cellules par apoptose (Banerjee and Chatterjee, 2003). La fonction transactivatrice de VDR est augmentée par l'interaction avec son ligand, le 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3), un métabolite de la vitamine D3 (Dusso et al., 2005).

EBNA-3A est retrouvée co-immunoprécipitée avec VDR dans les LCL (Yenamandra et al., 2010). L'utilisation de LCL immortalisée par un virus recombinant dépourvu du gène codant pour la protéine EBNA-3A (LCL Δ 3A) a permis de mettre en évidence que la protéine EBNA-3A réprime les gènes cibles du récepteur VDR. De manière intéressante le gène *CDKN1A*, codant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{CIP1} est un gène cible de VDR et est plus activé dans les LCL Δ 3A par rapport au LCL sauvages. Enfin, alors que le traitement des LCL Δ 3A par le 1,25(OH)2D3 induit une mort des cellules par apoptose, le même traitement sur des LCL exprimant EBNA-3A n'a pas d'effet. EBNA-3A est donc capable de protéger les cellules contre l'apoptose induite par la vitamine D3.

II. 2. 4. Régulation par EBNA-3C des processus métastatiques en coopération avec Nm-23-H1

La famille de gène *nm23* (huit gènes [*nm23-H1* à *-H8*] chez l'homme) code des protéines ayant une activité enzymatique de type kinase (Lacombe et al., 2000). Parmi ces protéines, NM23-H1 est connue pour avoir une fonction de suppresseur de métastase (Steeg et al., 1988; Lim et al., 1998; Russell et al., 1998).

Subramanian et ses collaborateurs ont montré qu'EBNA-3C interagit avec NM23-H1 (Subramanian et al., 2001) par une région de 38 acides aminés (aa 637-675) située dans la région C-Terminale d'EBNA-3C (Subramanian and Robertson, 2002). Cette interaction permet de relocaliser NM23-H1, essentiellement cytoplasmique, dans le noyau des cellules

exprimant EBNA-3C. De plus, lorsqu'EBNA-3C est co-exprimée avec NM23-H1 dans des lignées de cellules BJAB (Lymphome de Burkitt EBV négatif) ou des cellules de carcinome mammaire, EBNA-3C inhibe l'effet anti-migratoire de NM23-H1, augmentant ainsi la migration cellulaire (Subramanian et al., 2001). Enfin, la protéine NM23-H1 fusionnée avec le domaine de fixation à l'ADN de GAL4 est capable d'activer la transcription d'un gène rapporteur contenant des sites de fixation pour GAL4. Lorsqu'EBNA-3C est co-exprimée avec NM23-H1 l'activation de la transcription par NM23-H1 est augmentée (Subramanian and Robertson, 2002). Ces résultats indiquent qu'EBNA-3C peut réguler la localisation cellulaire et la fonction de la protéine cellulaire NM23-H1. Parmi les gènes cellulaires régulés suite à la translocation de NM23-H1 par EBNA-3C, on trouve les gènes *ITGAV*, *cox-2* et *mmp-9* (Fig 8).

II. 2. 4. 1. Régulation de la migration cellulaire par l'intégrine $\alpha 5$

Les intégrines sont des récepteurs hétéromériques de surface des cellules pour des constituants de la matrice extra-cellulaire (MEC). Ils sont composés de deux sous unités, une α et une β . Le gène *ITGAV* code pour l'intégrine $\alpha 5$, une protéine impliquée dans la migration et l'adhésion cellulaire et exprimée à la surface des cellules en migration, comme les cellules de mélanome métastatique ou encore de cancer du sein (Albelda et al., 1990; Filardo et al., 1995). Choudhuri et ses collaborateurs ont montré que la protéine NM23-H1 réprime l'activation du gène de l'intégrine $\alpha 5$ alors qu'au contraire EBNA-3C l'active (Choudhuri et al., 2006). De plus, l'utilisation d'un mutant d'EBNA-3C n'interagissant plus avec NM23-H1 active toujours le promoteur de l'intégrine $\alpha 5$, indiquant ainsi que l'effet activateur d'EBNA-3C est indépendant de son interaction avec NM23-H1. En effet, Choudhuri et ses collègues ont montré que NM23-H1 inhibe la transcription de l'intégrine $\alpha 5$ en interagissant avec le facteur de transcription GATA-1 alors qu'EBNA-3C interagit lui avec le facteur Sp1 (Choudhuri et al., 2006). En activant la transcription du gène de l'intégrine $\alpha 5$, EBNA-3C participerait à l'augmentation de la motilité cellulaire des cellules infectées par EBV (**Fig 8A**).

II. 2. 4. 2. Régulation de la métalloprotéinase matricielle 9

Les métalloprotéinases matricielles ou MMP sont des endopeptidases capables de dégrader un ou plusieurs composants de la matrice extracellulaire et sont impliquées dans les phénomènes de métastase (Westermarck and Kähäri, 1999; Stamenkovic, 2000). Pour le

moment, 21 MMP ont été identifiées chez l'homme. Un certain nombre de MMP comme les MMP-2 et MMP-9 qui dégradent le collagène de type 4 (composant majeur de la matrice extracellulaire) sont associées à la migration cellulaire et aux processus d'invasions (Giannelli et al., 1997; Reddy et al., 1999).

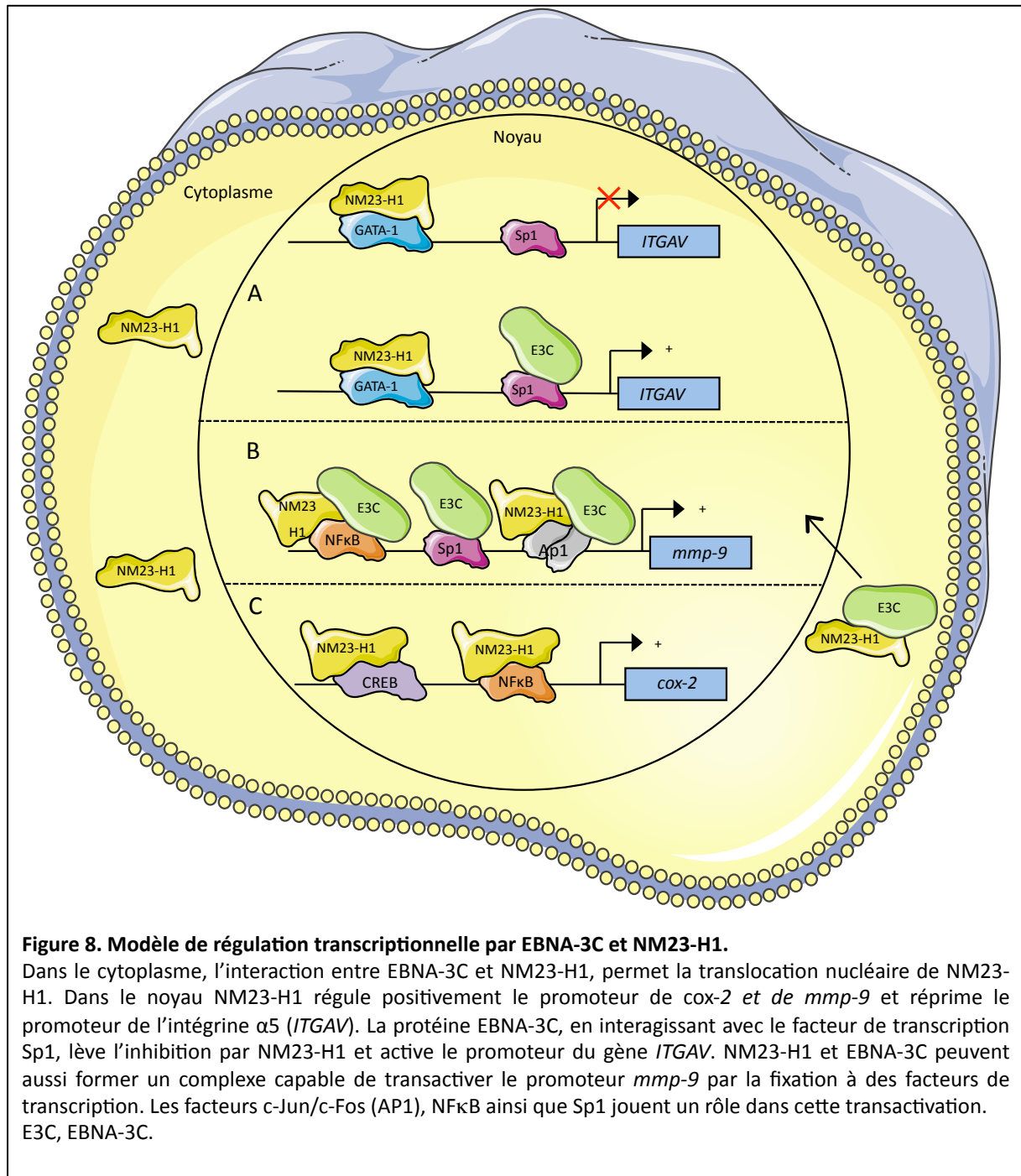


Figure 8. Modèle de régulation transcriptionnelle par EBNA-3C et NM23-H1.

Dans le cytoplasme, l'interaction entre EBNA-3C et NM23-H1, permet la translocation nucléaire de NM23-H1. Dans le noyau NM23-H1 régule positivement le promoteur de *cox-2* et de *mmp-9* et réprime le promoteur de l'intégrine $\alpha 5$ (*ITGAV*). La protéine EBNA-3C, en interagissant avec le facteur de transcription Sp1, lève l'inhibition par NM23-H1 et active le promoteur du gène *ITGAV*. NM23-H1 et EBNA-3C peuvent aussi former un complexe capable de transactiver le promoteur *mmp-9* par la fixation à des facteurs de transcription. Les facteurs c-Jun/c-Fos (AP1), NFkB ainsi que Sp1 jouent un rôle dans cette transactivation. E3C, EBNA-3C.

Kuppers et ses collaborateurs ont montré qu'individuellement NM23-H1 et EBNA-3C peuvent activer l'expression du gène *mmp-9*. De plus, lorsque les deux protéines sont co-

exprimées cette activation est significativement plus forte, signifiant que NM23-H1 et EBNA-3C sont capables de coopérer pour l'activation de la transcription. Cette transactivation est dépendante des facteurs de transcription Ap1 et NFκB. De plus, le facteur Sp1 semble lui aussi jouer un rôle dans cette activation (Kuppers et al., 2005). Enfin, EBNA-3C est retrouvée liée à l'ADN dans un complexe protéique comprenant NM23-H1/NFκB et NM23-H1/Ap1. Le modèle proposé pour l'activation du gène *mmp-9* est donc le suivant : d'une part EBNA-3C entraîne la translocation de Nm23-H1 dans le noyau, puis EBNA-3C et NM23-H1 forment un complexe multiprotéique capable de réguler l'expression de la protéine MMP-9 à travers les facteurs de transcription NFκB, Ap1 et Sp1 (**Fig 8B**).

II. 2. 4. 3. Régulation de la cyclo-oxygénase 2

La cyclo-oxygénase (COX) est une enzyme qui permet la formation de prostaglandine (Smith et al., 2000b). La sur-expression de *cox-2* est un phénomène commun à différents cancers et est liée à l'angiogenèse et au développement de métastases (Molina et al., 1999; Peng et al., 2005). De manière intéressante, le gène *cox-2* est induit dans les cellules infectées par EBV (Kaul et al., 2006).

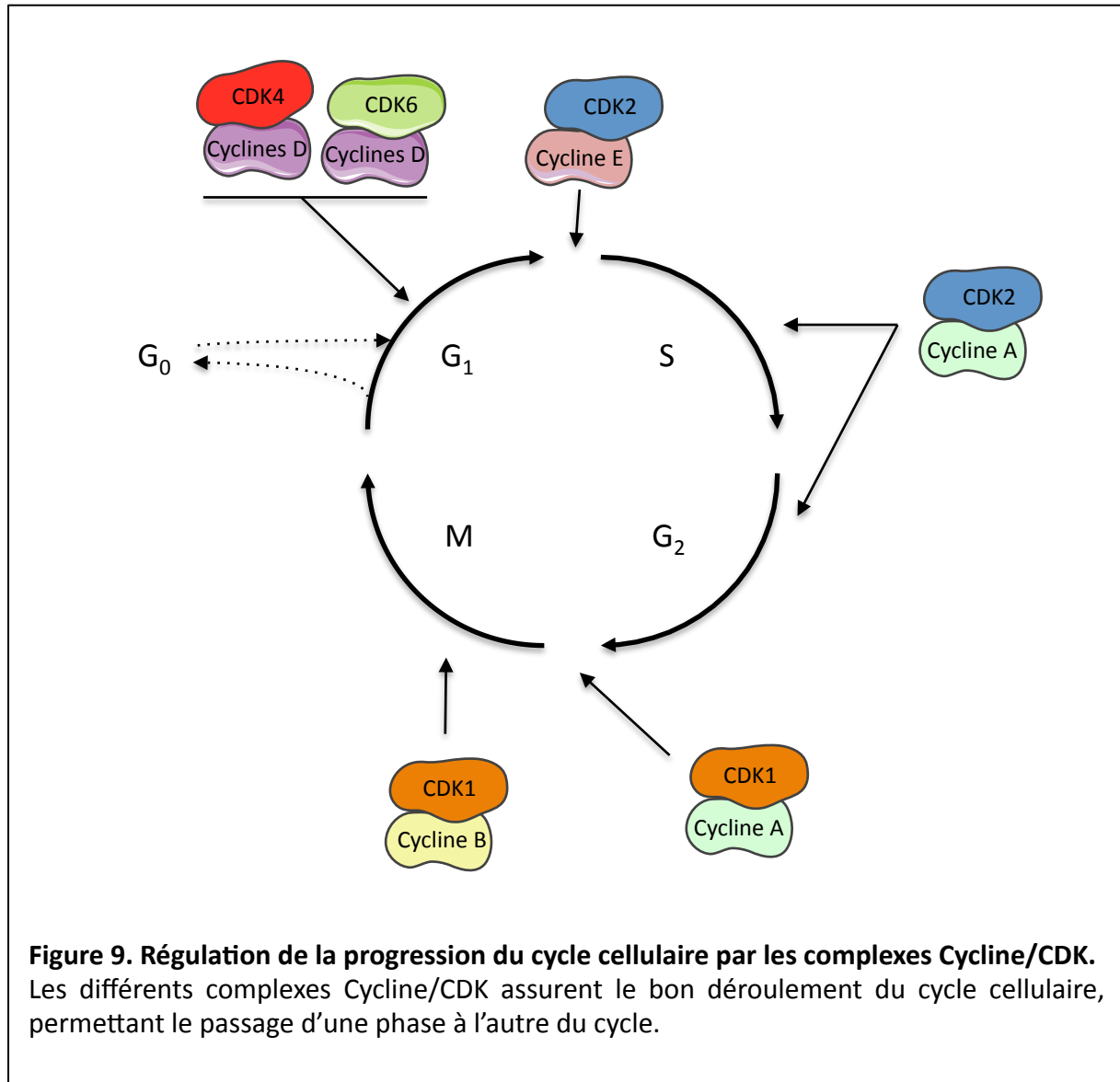
Kaul et ses collègues ont montré que NM23-H1 active la transcription au promoteur de *cox-2* d'une manière dose dépendante alors qu'EBNA-3C seule ne le peut pas (Kaul et al., 2006). Cependant, lorsqu'EBNA-3C et NM-23H1 sont co-exprimées le gène *cox-2* est sur-exprimé par rapport à l'expression seule de NM23-H1, et l'expression d'un mutant d'EBNA-3C n'interagissant plus avec NM23-H1 ne peut plus co-activer le promoteur du gène *cox-2*. Enfin, les auteurs ont montré que l'activation du gène *cox-2* par NM23-H1 passe par les facteurs de transcription CREB et NFκB. Le modèle serait donc que la protéine EBNA-3C permet la translocation nucléaire de NM23-H1, activant la transcription du gène codant pour COX-2, par l'intermédiaire de NFκB et CREB (**Fig 8C**). Cependant ces auteurs n'ont pas regardé si EBNA-3C était impliquée directement dans la co-activation du promoteur du gène *cox-2* par l'intermédiaire des facteurs NFκB ou CREB.

III. Les protéines EBNA3 et le cycle cellulaire

III. 1. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire des eucaryotes présente une alternance de deux phases, une phase de croissance encore appelée interphase et une phase de division ou mitose. L'interphase est

composée d'une phase G_1 , d'une phase S (permettant la réplication de l'ADN) et d'une phase G_2 . Puis, la mitose (phase M) permet à la cellule de se diviser en deux cellules filles. Enfin, les cellules quiescentes sont dans une phase appelée G_0 (**Fig 9**).



La transition entre les différentes phases du cycle cellulaire est régulée par différentes protéines, les cyclines et les kinases cyclines-dépendantes (CDK). Les CDK sont les protéines régulatrices clés du cycle cellulaire qui, en association avec les cyclines, vont phosphoryler des protéines cibles jouant un rôle dans le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est ainsi régulé par au moins six complexes Cycline/CDK intervenant à des étapes précises du cycle (**Fig 9**) (Vermeulen et al., 2003). L'activité des CDK est elle même régulée par des protéines inhibitrices des CDK, les CDKi. Deux familles distinctes de CDKi ont été découvertes, la

famille INK4 et la famille CIP/KIP (Sherr and Roberts, 1995; Roussel, 1999; Vermeulen et al., 2003). La famille INK4 est composée des protéines p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}. Ces quatre protéines inhibent spécifiquement les kinases cyclines-dépendantes de la phase G₁ (CDK4 et CDK6). Ces protéines inhibitrices forment des complexes stables avec les CDK4-6 inhibant ainsi leur association avec la cycline D et donc leur activité (Sherr and Roberts, 1995; Carnero and Hannon, 1998). La deuxième famille de protéines inhibitrices du cycle cellulaire, la famille CIP/KIP, est composée des protéines p21^{CIP1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}. Ces protéines, contrairement aux protéines INK4, sont capables d'inhiber toutes les kinases cyclines-dépendantes (Mainprize et al., 2001). De manière intéressante, les protéines CIP/KIP ont un effet variable sur les CDK4/6 (phase G₁) en fonction de leur niveau d'expression. En effet, alors qu'un faible niveau d'expression de ces protéines stimule l'activité des CDK, une forte expression inhibe leur activité (Mainprize et al., 2001).

En plus des complexes Cycline/CDK, il existe des mécanismes de surveillance capables d'imposer l'arrêt du cycle cellulaires lorsque des anomalies sont détectées. Ces mécanismes interviennent lorsque des lésions ou des problèmes de réplication de l'ADN sont détectés. La perturbation de ces mécanismes de contrôle est à la base des processus cancéreux, ainsi que de la transformation de cellules par des virus à ADN tels que les papillomavirus ou les adénovirus.

III. 2. Fonctions des EBNA3 dans le cycle cellulaire

EBV étant capable, *in vitro*, d'immortaliser des lymphocytes B, il n'est pas surprenant qu'il puisse déréguler le cycle cellulaire. Il a de plus été montré que les protéines virales EBNA2 et EBNA-LP permettent la transition de la phase G₀ à G₁ du cycle cellulaire. Très vite il s'est donc posé la question du rôle des protéines EBNA3 dans la régulation du cycle cellulaire.

Une des premières études, menée par Parker et ses collègues, a montré que l'expression d'EBNA-3C dans des cellules cultivées en absence de sérum (entraînant normalement un arrêt en phase G₁), permet la progression du cycle cellulaire et le passage du point de surveillance G₁/S (Parker et al., 2000). Cette même étude a aussi permis de montrer que la protéine EBNA-3C bloque le point de contrôle du fuseau mitotique, indiquant qu'EBNA-3C agit à différents niveaux du cycle. Puis, Maruo *et* ses collaborateurs ont montré que l'absence d'EBNA-3A ou -3C dans des LCL induit un arrêt des cellules immortalisées par EBV et une mort des cellules par apoptose. De plus, ce blocage ne peut pas être levé par

les autres protéines EBNA3 (Maruo et al., 2003, 2006). Ces résultats suggèrent que les protéines EBNA3 régulent le cycle cellulaire et qu'EBNA-3A et -3C ont des fonctions distinctes et importantes dans la progression de ce cycle.

III. 2. 1. Les protéines EBNA3 et les différentes phases du cycle

III. 2. 1. 1. La transition G₁/S

Les cyclines D (D1, D2 et D3), exprimées en milieu de phase G₁, sont indispensables pour la progression du cycle cellulaire (Baldin et al., 1993). Parmi ces cyclines D, la cycline D1 est la plus ubiquitaire et est retrouvée sur-exprimée dans un grand nombre de pathologies (Gansauge et al., 1997; Benzeno et al., 2006). Les complexes Cycline D/CDK4-6 favorisent la transition G₁/S en phosphorylant la protéine du Rétinoblastome (pRb). Cette protéine pRb est très importante pour la transition G₁/S. En effet si pRb est non phosphorylée, ou hypophosphorylée, cette dernière interagit avec le facteur de transcription E2F, le rendant inactif. En fin de phase G₁, pRb est phosphorylée par le complexe Cycline D/CDK4-6 ce qui a pour effet de libérer le facteur de transcription E2F1 qui contrôle l'expression de gènes nécessaires à la transition G₁/S et à la progression de la phase S (synthèse des Cyclines E et A, entre autres) (Diehl et al., 1998; Lin et al., 2006). Puis, la cycline D1 est phosphorylée par la protéine GSK3 β (Glycogène synthase kinase-3beta) ce qui déclenche son transport vers le cytoplasme, son ubiquitination et sa dégradation via le protéasome (Lin et al., 2006)

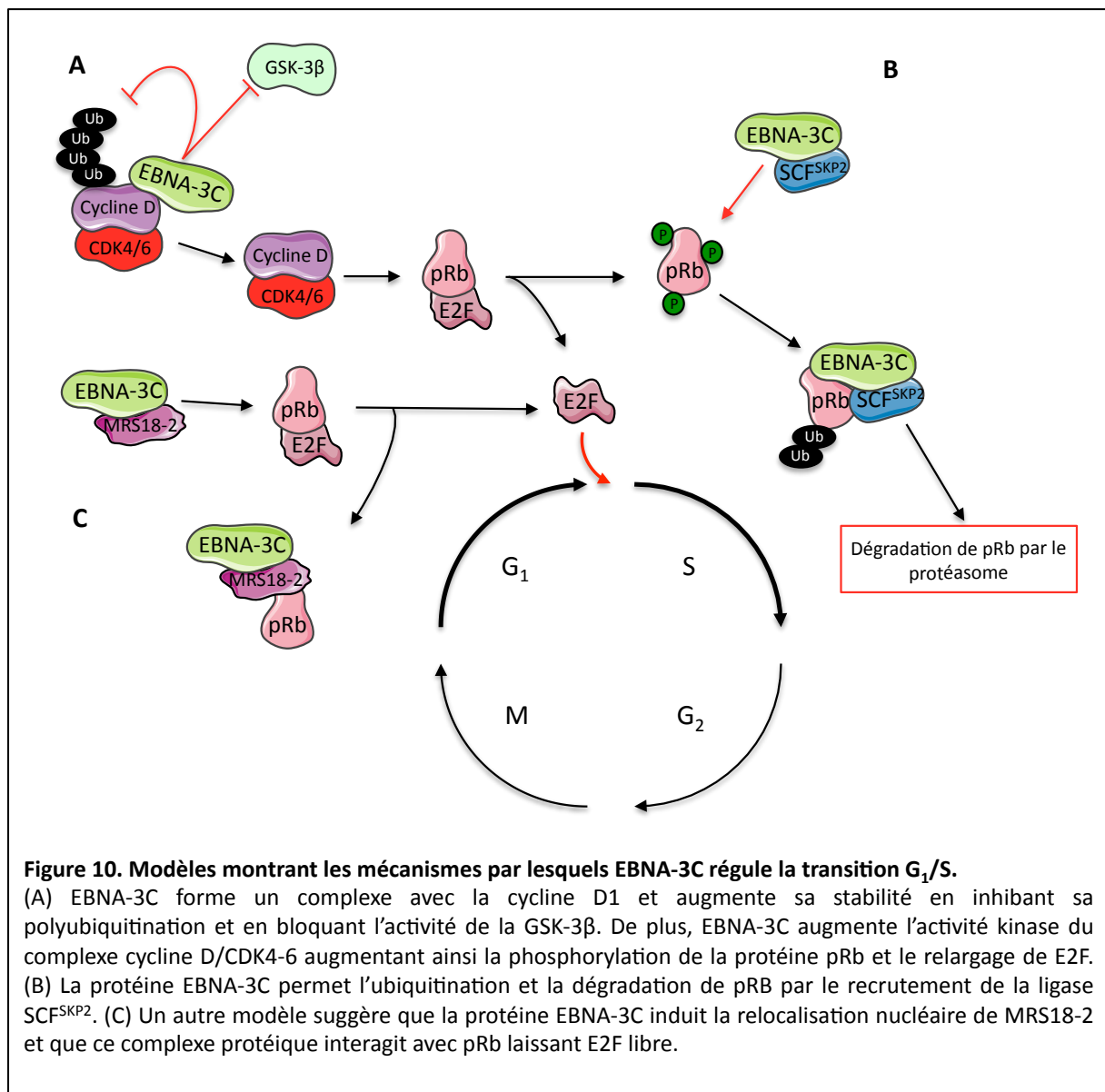
De manière intéressante, il a été montré que la protéine EBNA-3C est capable d'interagir avec les trois cyclines D1, D2 et D3. EBNA-3C interagit avec la cycline D1 (Knight et al., 2004; Saha et al., 2011) au niveau de sa région N-Terminale (aa 130-160) et permet d'augmenter, *in vitro*, l'activité kinase associée au complexe cycline D1/CDK4-6 ce qui permet une plus grande phosphorylation de la protéine pRb. Afin de promouvoir la transition G₁/S, la localisation nucléaire de la cycline D1 est essentielle. Alors que la cycline D1 est majoritairement détectée dans le cytoplasme en absence d'EBNA-3C, elle est retrouvée localisée dans le noyau en sa présence. De plus, EBNA-3C interagit avec la protéine GSK3 β , protéine kinase favorisant l'export nucléaire de la cycline D1. *In vitro*, la protéine EBNA-3C est capable de réduire l'activité kinase de la GSK3 β , bloquant ainsi l'export de la cycline D1 (**Fig 10A**). Enfin, EBNA-3C inhibe la polyubiquitination de la protéine cycline D1, augmentant ainsi sa demi-vie et la co-expression dans des cellules HEK 293T d'EBNA-

3C et du complexe cycline D1/CDK6 permet d'augmenter la poly-ubiquitination de la protéine pRb par rapport à l'expression seule d'EBNA-3C et donc d'augmenter sa dégradation (**Fig 10A**).

Un mécanisme commun aux protéines virales de virus oncogènes est la dérégulation du cycle cellulaire par la modulation de la protéine pRb. En effet, l'antigène T de SV40, la protéine E1A de l'adénovirus, ou encore la protéine E7 du papillomavirus régulent la progression du cycle cellulaire en inactivant la protéine pRb (DeCaprio et al., 1988; Dyson et al., 1989; Whyte et al., 1989). La protéine EBNA-3C est elle aussi capable d'interagir *in vitro* avec pRb et l'expression d'EBNA-3C dans des cellules HEK 293T réduit la demi-vie de la protéine pRb sans cependant induire le moindre changement dans sa phosphorylation (Parker et al., 1996; Knight et al., 2005a). Cette dégradation de la protéine pRb par EBNA-3C est dépendante du protéasome ainsi que de l'ubiquitination de la protéine pRb (Knight et al., 2005a, 2005b). Cependant, dans le contexte plus physiologique des LCL, il a été montré au contraire que l'inactivation d'EBNA-3C n'induit pas la dégradation de pRb mais plutôt une baisse de la forme hyperphosphorylée de pRb (Maruo et al., 2006). De manière intéressante, la partie N-Terminale d'EBNA-3C (aa 101 à 200) qui interagit avec pRb est aussi impliquée dans l'interaction avec le complexe SCF^{SKP2} (Knight et al., 2005b). Ce complexe, composé des protéines SKP1, SKP2, Cul1 et Roc1 possède une activité ubiquitine E3 ligase responsable de l'ubiquitination de substrats spécifiques qui seront alors dégradés par le protéasome. Le complexe protéique formé par EBNA-3C et SCF^{SKP2} pourrait donc être impliqué dans la dégradation de pRb observée par Knight et ses collègues. Pour conforter cette hypothèse les auteurs ont exprimé un dominant négatif de SKP2, bloquant ainsi l'activité du complexe SCF^{SKP2} : en présence de ce dominant négatif et de la protéine EBNA-3C, la régulation de pRb est bloquée. De plus, si on bloque le protéasome, pRb est stabilisée, signifiant que la dégradation de pRb induite par EBNA-3C est bien dépendante du protéasome et du complexe SCF^{SKP2} (**Fig 10B**).

Comme nous venons de le voir, la protéine EBNA-3C est capable d'augmenter ou d'inhiber l'ubiquitination de cibles spécifiques. Même si le mécanisme par lequel EBNA-3C bloque l'ubiquitination de la cycline D1 n'est pas encore élucidé, il est connu que SCF^{SKP2} est impliquée dans la dégradation de la cycline D1 (Yu et al., 1998; Ganiatsas et al., 2001). EBNA-3C pourrait donc, contrairement à ce qui a été montré pour pRb, inhiber SCF^{SKP2} et réduire ainsi l'ubiquitination de la cycline D1.

Les protéines EBNA3 pourraient elles même être régulées par dégradation par le protéasome, cependant, les résultats sont contradictoires. En effet, la protéine EBNA-3C est capable non seulement d'interagir avec le complexe SCF^{SKP2}, mais aussi d'être ubiquitinée sur sa partie-N-Terminale (Knight et al., 2005b). Une étude a aussi montré que la protéine EBNA-3C (tout comme EBNA-3A et -3B) interagit dans des cellules B (DG75) avec la sous-unité C8/α7 du protéasome 20S et est dégradée *in vitro* par le protéasome 20S (Touitou et al., 2005). Cependant dans les LCL la protéine EBNA-3C apparaît extrêmement stable et ne semble pas être dégradée par le protéasome (Touitou et al., 2005).



Le rôle exact d'EBNA-3C sur la voie pRb/E2F est cependant encore loin d'être compris. En effet alors que Knight et ses collaborateurs concluent que la protéine EBNA-3C

interagit de manière directe avec pRb (Knight et al., 2005a), une autre étude menée par Kashuba et ses collègues indique que l'interaction n'est pas directe mais passe par l'intermédiaire de la protéine MRS18-2 (Kashuba et al., 2008). Cette protéine, localisée dans le cytoplasme, est relocalisée dans le noyau grâce à EBNA-3C. MRS18-2 est connue pour interagir avec pRb et faire la compétition avec le facteur de transcription E2F1 pour l'interaction avec pRb, augmentant ainsi le niveau de protéine E2F1 libre (**Fig 10C**).

Un autre facteur pourrait avoir un rôle important dans la transition G₁/S, il s'agit du récepteur AhR. En effet, il a été montré que AhR interagit avec la protéine pRb (Puga et al., 2000). Le récepteur AhR forme alors un complexe multiprotéique avec pRb, E2F et DP (co-activateur de E2F) et réprime les gènes régulés par E2F bloquant ainsi le passage en phase S (Puga et al., 2000; Marlowe et al., 2004; Huang and Elferink, 2005). De manière intéressante, nous avons vu dans le paragraphe précédant que la protéine EBNA-3A interagit avec le récepteur AhR. Par cette interaction EBNA-3A pourrait bloquer l'effet négatif de AhR sur le cycle cellulaire. Cependant aucune étude n'a pour le moment été effectuée sur le rôle de cette interaction dans la progression du cycle cellulaire.

Le rôle de la protéine EBNA-3C dans la voie pRb-E2F régulant la progression du cycle cellulaire semble donc crucial. Dans cette voie, le facteur E2F1 joue un double rôle en contrôlant à la fois la croissance cellulaire et la mort des cellules par apoptose (Johnson et al., 1993; Wu et al., 2009). En effet, en réponse à des dommages à l'ADN, le facteur de transcription E2F1 transactive l'homologue de p53, p73, ainsi que le gène *apaf-1* (apoptosis activating factor-1) (Pediconi et al., 2003). Une étude récente a montré que la protéine EBNA-3C interagit avec le facteur E2F1 par deux domaines, un premier dans la région N-Terminale et un deuxième en C-Terminal (Saha et al., 2012). L'utilisation d'un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur régulé par E2F1 a permis aux auteurs de mettre en évidence la capacité de la protéine EBNA-3C à bloquer l'activation du gène rapporteur par E2F1. Enfin, il a été montré qu'EBNA-3C est capable d'inhiber l'apoptose induite par E2F1 après dommages à l'ADN, et que cette inhibition est p53 indépendante. De plus, en présence d'EBNA-3C, le facteur de transcription E2F1 n'est plus capable d'activer ses gènes cibles. Par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine, il a été montré qu'EBNA-3C réprime la fixation à l'ADN de E2F1 en interagissant avec sa partie N-Terminale, région responsable de la fixation à l'ADN (Saha et al., 2012). De manière concordante, l'expression d'EBNA-3C dans des LCL réduit

considérablement l'activation des deux gènes cibles d'E2F1 codant respectivement pour les protéines p73 et APAF1, mais réduit aussi la quantité de protéine E2F1, suggérant un effet d'EBNA-3C sur la stabilité de E2F1. Les travaux de Saha et ses collègues ont ainsi montré que cet effet passe par la voie ubiquitine-protéasome. Le facteur de transcription E2F1 joue donc un double rôle dans les cellules infectées par EBV. En effet, alors qu'un siARN contre E2F1 réduit grandement la croissance de LCL, ces même cellules sont fortement résistantes à l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN (Saha et al., 2012). Ces résultats indiquent que le facteur E2F1 agit soit comme un oncogène soit comme un suppresseur de tumeur en réponse à différents stimuli. Il est possible que différents gènes cibles d'E2F1 soient sélectivement régulés par le complexe EBNA-3C-E2F1 durant le cycle cellulaire ou en réponse aux dommages à l'ADN. D'autres études sont nécessaires pour approfondir le rôle de cette interaction dans le cycle cellulaire.

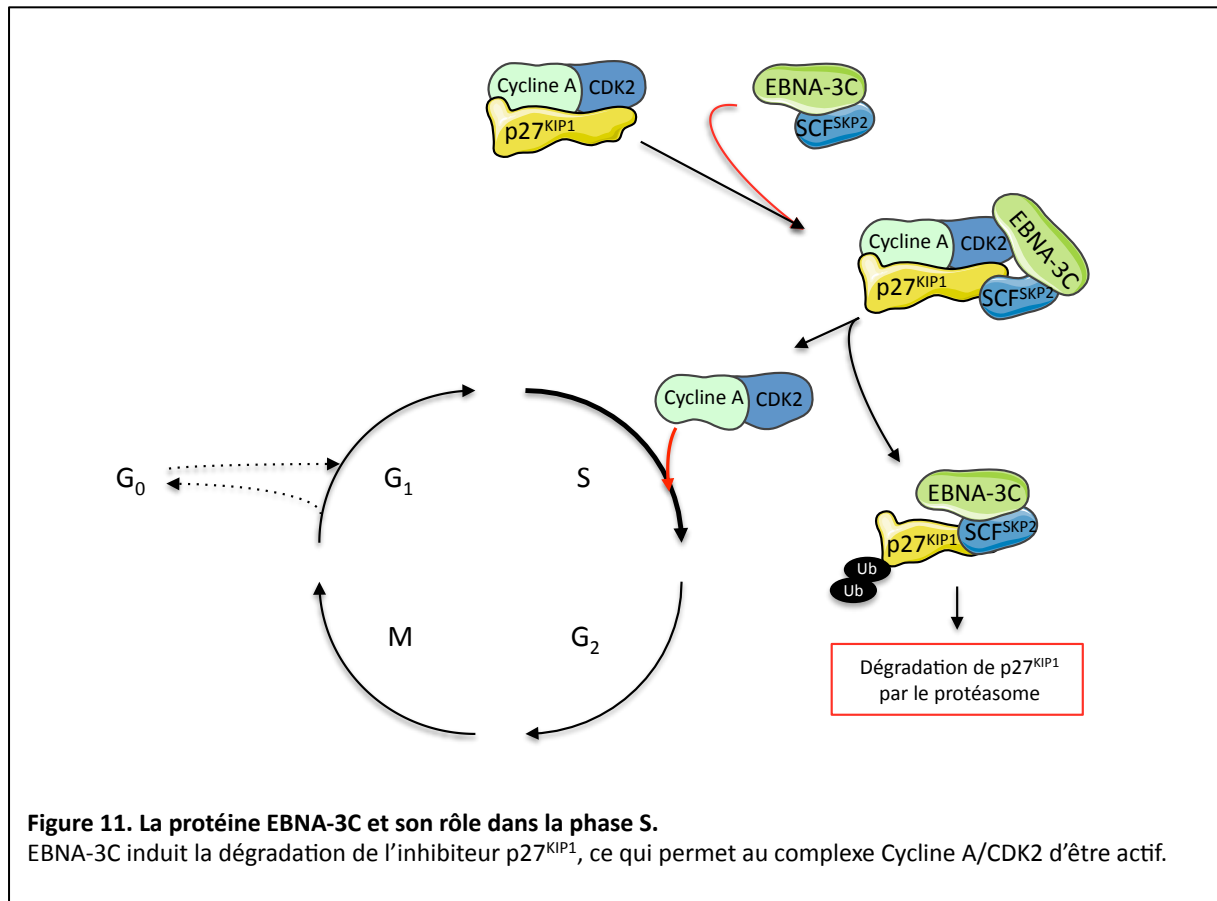
III. 2. 1. 2. La phase S

Au cours de la phase S, la protéine CDK2 s'associe à la cycline A et permet le maintien de la phosphorylation de pRb (Resnitzky et al., 1995). Le complexe cycline A/CDK2 est aussi important pour l'initiation de la réplication de l'ADN cellulaire (Voitenleitner et al., 1997). Après la réplication de l'ADN, le complexe cycline A/CDK2 phosphoryle et bloque l'interaction de E2F avec l'ADN signalant la fin de la phase S (Xu et al., 1994; Kitagawa et al., 1995). La cycline A est donc une protéine très importante, nécessaire pour la progression de la phase S ainsi que pour l'entrée en mitose (Pagano et al., 1992). Enfin, l'activité du complexe cycline A/CDK2 est régulée par l'inhibiteur p27^{KIP1} qui interagit et inhibe le complexe (Resnitzky et al., 1995).

En plus d'interagir avec les cyclines D, il a été montré que la protéine virale EBNA-3C interagit fortement avec la cycline A (Knight et al., 2004) via son domaine N-Terminal (aa 130 à 159). Cette capacité d'interagir avec la cycline A semble conservée entre les trois protéines EBNA3, bien qu'EBNA-3C interagisse plus efficacement qu'EBNA-3A et EBNA-3B (Knight et al., 2004).

Quelle que soit la phase du cycle cellulaire les inhibiteurs des CDK, comme p27^{KIP1}, bloquent la progression du cycle en se fixant sur n'importe quel complexe cycline/CDK et en inhibant son activité. Il a été montré que la sur-expression d'EBNA-3C entraîne la baisse de la quantité de p27^{KIP1} (Parker et al., 2000; Knight and Robertson, 2004), suggérant un rôle

d'EBNA-3C dans la régulation de la stabilité de cette protéine. Pour expliquer ce mécanisme il a été montré qu'EBNA-3C recrute le complexe SCF^{SKP2} ubiquitine ligase et augmente l'ubiquitination de p27^{KIP1} permettant ainsi la dégradation de p27^{KIP1} par le protéasome (Knight et al., 2005b) (Fig 11).



Puisqu'EBNA-3C n'interagit pas directement avec la protéine p27^{KIP1}, il a été suggéré que des protéines intermédiaires, comme la cycline A, pourrait être importantes pour le recrutement de p27^{KIP1} au complexe SCF^{SKP2} par la protéine EBNA-3C (Knight et al., 2005b). Il a enfin été montré qu'en perturbant l'inhibiteur p27^{KIP1}, EBNA-3C augmente l'activité kinase associée au complexe Cycline A/CDK2 (Knight and Robertson, 2004), permettant ainsi la progression de la phase S.

III. 2. 1. 3. La phase G₂/M

En phase G₂, la cycline A interagit avec la kinase CDK1 permettant l'entrée en phase M. La mitose est ensuite régulée par le complexe cycline B/CDK1 (Vermeulen et al., 2003).

En réponse au traitement des cellules par des drogues cytotoxiques (HU, ABHA, Etoposide), on obtient un arrêt des cellules en phase G₂/M. Krauer et ses collègues ont montré que les trois protéines EBNA3, individuellement, permettent aux cellules de passer outre ce point de contrôle et de continuer le cycle avec, cependant, des dommages importants pour les cellules (Krauer et al., 2003). Tous les agents qui bloquent la phase G₂/M activent la voie ATM/ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated / Ataxia Telangiectasia and Rad3-related). Ce mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN (DDR pour DNA Damage Response) est un processus se déroulant au moment de la phase G₂ du cycle cellulaire et qui bloque la progression en inhibant l'activation du complexe cycline B/CDK1. Cette voie commence par l'activation des kinases Chk1/Chk2 et aboutit au blocage de l'activation du complexe cycline B/CDK1.

De manière intéressante, il a été montré que l'infection de cellules B par EBV entraîne l'activation de la voie DDR et que cette voie passe par l'activation de la protéine ATM et de Chk2 (Nikitin et al., 2010). L'inhibition des kinases ATM et Chk2 augmente l'efficacité de transformation et de prolifération des lymphocytes B après infection par EBV, ce qui indique que l'activation de cette voie permet d'inhiber la transformation des cellules B par EBV. Il a ensuite été montré que des cellules B infectées par un virus dont le génome est dépourvu du gène codant pour EBNA-3C montre une plus forte activation de la voie DDR, tandis que l'infection de cellules par un virus dépourvu du gène codant pour EBNA-3A montre le même niveau d'activation de la voie DDR que l'infection de cellules B par un virus sauvage (Nikitin et al., 2010). Ces résultats suggèrent que la protéine EBNA-3C permet d'inhiber l'activation de la DDR et que cette inhibition est spécifique à EBNA-3C. Le mécanisme exact de cette inhibition reste à déterminer mais il a déjà été montré que la protéine EBNA-3C ne bloque pas l'activation par phosphorylation des kinases ATM et chk2 (Gruhne et al., 2009). Le modèle suggéré par les auteurs est donc que la protéine virale EBNA-3C atténue l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN, ce qui favorise la transformation et l'immortalisation des cellules B (Nikitin et al., 2010; Li and Hayward, 2011).

Par ailleurs, il a été montré que les protéines EBNA-3A et EBNA-3C interagissent avec la kinase Chk2 (Krauer et al., 2003; Choudhuri et al., 2007) et qu'EBNA-3C dérégule le point de surveillance G₂/M induit par le nocodazole via la protéine Chk2, puisque l'inhibition par siRNA de Chk2 diminue la capacité d'EBNA-3C à passer le point de contrôle G₂/M (Choudhuri et al., 2007). De plus, l'expression d'EBNA-3C réprime la transcription du gène codant pour Chk2 suggérant que l'activité répressive d'EBNA-3C est aussi importante pour la régulation de ce point de surveillance.

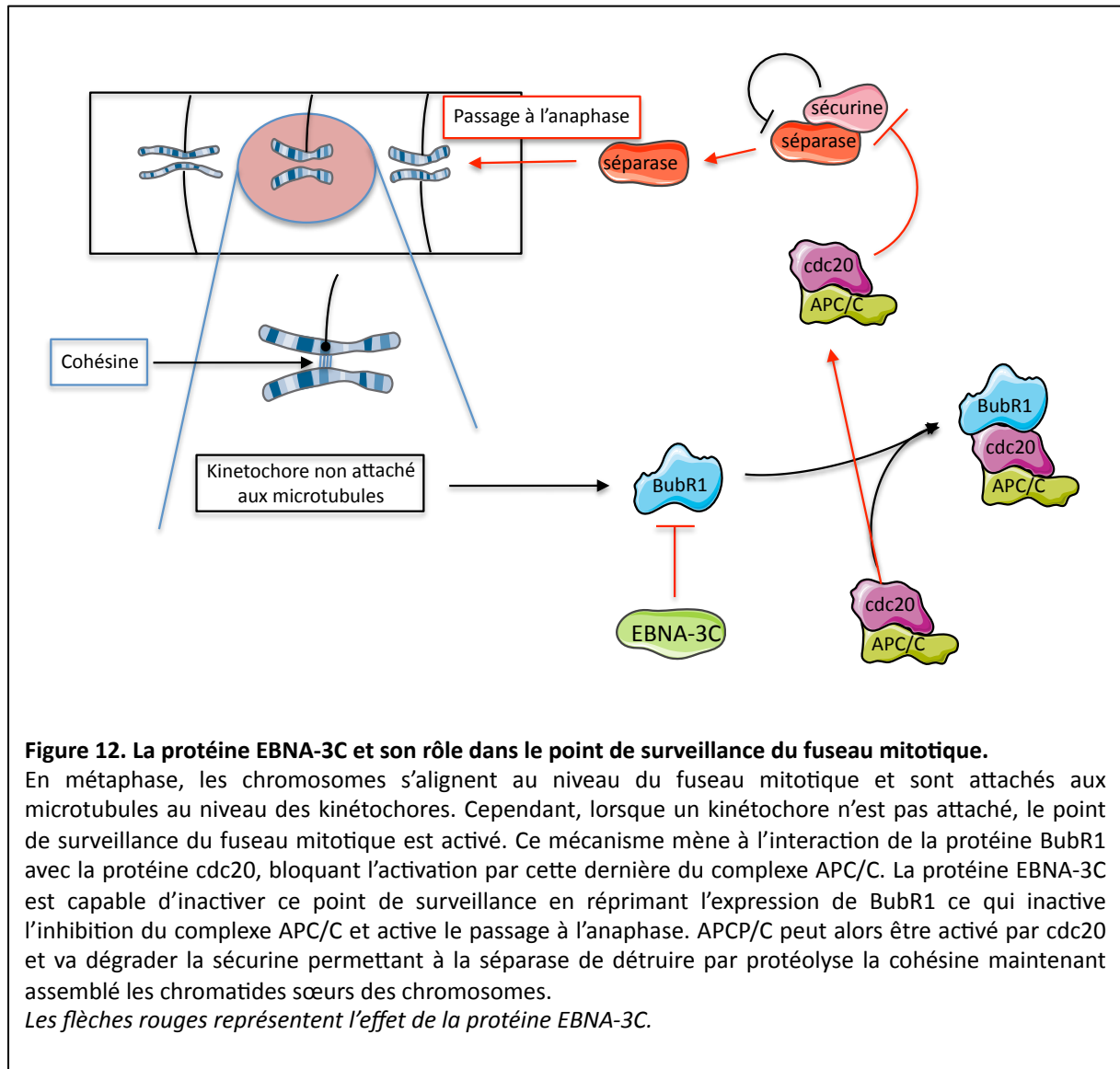
Même si l'étude de Choudhuri et ses collaborateurs ne permet pas de conclure sur le mécanisme exact par lequel EBNA-3C inhibe le point de contrôle G₂/M il est clair que la protéine EBNA-3C régule négativement la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) (Krauer et al., 2003; Nikitin et al., 2010).

III. 2. 1. 4. Le point de surveillance du fuseau mitotique

L'attachement des chromosomes au fuseau mitotique est une étape cruciale dans la séparation des chromatides sœurs lors de la mitose. L'intégrité du fuseau mitotique est indispensable pour éviter une répartition anormale des chromosomes (aneuploïdie). Lorsqu'un problème est détecté, le point de surveillance du fuseau mitotique est activé, bloquant alors la transition métaphase/anaphase, jusqu'à ce que tous les chromosomes soient alignés sur la plaque équatoriale du fuseau mitotique. Le signal activant ce point de contrôle est généré au niveau du kinetochore, large complexe multiprotéique localisé sur le centromère de chaque chromosome et passe par l'inhibition de la protéine cdc20 qui normalement active le complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) (Musacchio and Salmon, 2007). Une fois activé le complexe APC/C, qui possède une activité de type ubiquitine ligase, permet la destruction de deux protéines clés, la cycline B et la sécurine. La sécurine est une protéine très importante car elle inhibe la protéase (la séparase) qui permet la séparation des deux chromatides sœurs en dégradant la cohésine qui les maintient assemblées. D'autres protéines très importantes pour l'activation de ce point de surveillance mitotique comme Mad1, Mad2, Bub3, et BubR1, sont recrutées au niveau du kinetochore et stabilisent le complexe microtubule-kinetochore. L'activation de ce point de contrôle mitotique mène à l'interaction de la protéine BubR1 à cdc20 empêchant cette dernière d'activer APC/C (Kulukian et al., 2009) (**Fig 12**).

La protéine EBNA-3C permet l'inhibition de ce mécanisme de surveillance. En effet, Parker et ses collègues ont montré que des cellules exprimant la protéine EBNA-3C sont capables d'outrepasser ce point de contrôle mitotique activé par le nocodazole, une drogue dépolymérisant les microtubules (Parker et al., 2000). Récemment, l'un des mécanismes par lequel EBNA-3C pourrait déréguler ce point de surveillance a été mis à jour. En effet, la protéine EBNA-3C réprime le gène codant pour la protéine BubR1 (Gruhne et al., 2009). De manière intéressante, l'inhibition de la protéine BubR1 mène à la désactivation du point de surveillance mitotique (Greene et al., 2008). En inhibant l'expression de BubR1, la protéine

EBNA-3C permettrait à cdc20 d'activer le complexe APC/C menant à la dégradation de la cohésine et à la séparation des chromatides sœurs (**Fig 12**).



III. 2. 2. Interaction des EBNA3 avec des protéines clés du cycle cellulaire

III. 2. 2. 1. La protéine p53

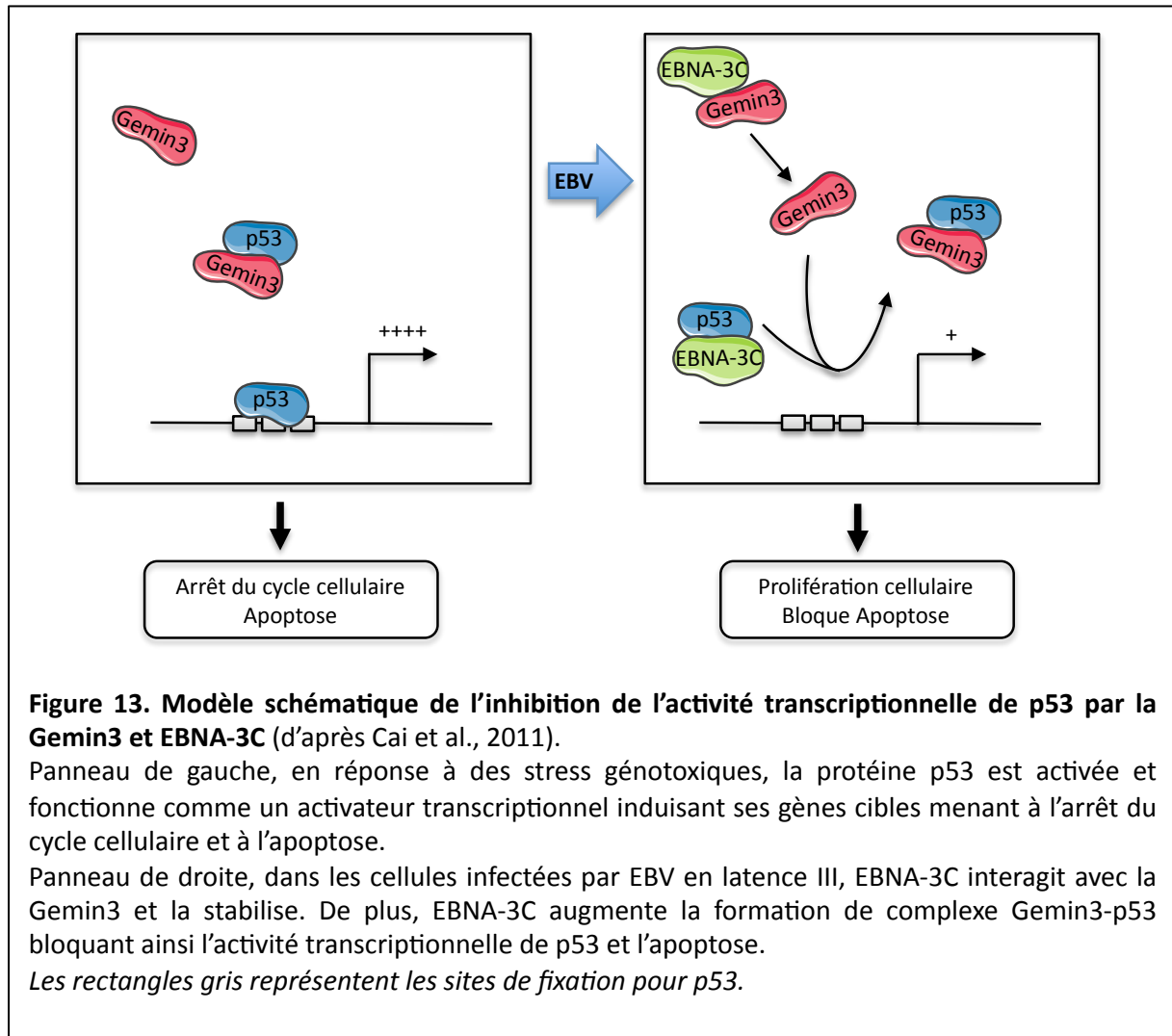
La protéine suppresseur de tumeur p53 est connue pour assurer le maintien de l'intégrité du génome. De ce fait, il n'est pas surprenant de retrouver le gène codant pour la protéine p53 muté dans de nombreux cancers humains. La protéine p53 est activée suite à des

dommages à l'ADN ou autres stress cellulaires. Elle provoque alors un arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mort par apoptose (Ko and Prives, 1996; Levine, 1997; Vogelstein et al., 2000). p53 interagit avec l'ADN et agit comme un activateur transcriptionnel dont l'une des cibles les plus connue est peut être le gène *CDKN1A* codant pour la protéine p21^{CIP1} (el-Deiry et al., 1993). L'expression de p53 est principalement régulée par son régulateur négatif Mdm2 avec lequel p53 interagit. La protéine Mdm2 est une ubiquitine ligase de type 3 permettant d'ubiquitiner et dégrader p53. Mdm2 est maintenue à un faible niveau dans des cellules non stressées. Cependant, en réponse à des stress la protéine p53 est stabilisée et activée par différents mécanismes qui bloquent l'interaction entre p53 et Mdm2 (Stommel and Wahl, 2004; Tang et al., 2006).

De manière intéressante, il a été montré que la protéine EBNA-3C est capable de bloquer l'apoptose induite par la protéine p53 (Yi et al., 2009). EBNA-3C co-localise et interagit avec la protéine p53 (Yi et al., 2009). La région d'EBNA-3C responsable de cette interaction est située en N-Terminale (aa 130-190) et est déjà connue pour interagir avec des protéines du cycle cellulaire (SCF^{SKP2}, cycline D1, cycline A, pRB). De plus, EBNA-3C interagit avec la partie C-Terminale de p53, région responsable de la fixation à l'ADN. Par cette interaction la protéine EBNA-3C réduit la capacité de p53 à se fixer à l'ADN, réprimant ainsi l'activité transcriptionnelle de cette dernière et la capacité de p53 à activer l'apoptose.

Récemment un autre mécanisme de perturbation de la protéine p53 par EBNA-3C a été identifié. En effet, la protéine EBNA-3C interagit et co-localise avec la protéine Gemin3, une protéine de la famille DEAD box jouant de nombreux rôles dans le métabolisme des ARN (Cordin et al., 2006). La région d'interaction d'EBNA-3C avec la Gemin3 se situe en C-Terminal entre les acides aminés 621 et 792 et la protéine Gemin3, comme EBNA-3C, interagit avec p53 au niveau de son domaine de fixation à l'ADN inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de p53 en empêchant sa fixation à l'ADN (Cai et al., 2011). Cai et ses collègues ont montré que la protéine EBNA-3C augmente la stabilité de la Gemin3, contribuant ainsi de manière indirecte à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de p53. En effet, alors que l'expression d'EBNA-3C dans des cellules contrôles réprime l'activation d'un gène rapporteur activé par la protéine p53, l'expression d'EBNA-3C dans des cellules n'exprimant plus la Gemin3 (expression inhibée par shARN), n'a plus d'effet sur ce gène rapporteur. De plus, l'inhibition de l'expression de la Gemin3 atténue très fortement le blocage par EBNA-3C de l'apoptose induite par p53, indiquant que la Gemin3 joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'activité de p53 par EBNA-3C. Enfin, puisque EBNA-3C

interagit avec p53 par son domaine N-Terminal et avec la Gemin3 par son domaine C-Terminal les auteurs suggèrent que la protéine EBNA-3C pourrait agir comme un adaptateur permettant d'augmenter l'interaction entre la Gemin3 et p53 (**Fig 13**).



Il a aussi été montré que la protéine EBNA-3C est impliquée dans la régulation de la stabilité de la protéine p53 en interagissant et en entraînant la déubiquitination de Mdm2 (Saha et al., 2009). Cette déubiquitination stabilise Mdm2, permettant d'augmenter l'ubiquitination et donc la dégradation de p53. De plus, EBNA-3C peut former un complexe tri-protéique avec p53 et Mdm2.

Enfin, il a récemment été montré que la protéine EBNA-3C peut réguler négativement les fonctions de p53 en interagissant avec des protéines régulatrices de son activité, les protéines de la famille des inhibiteurs de croissance ING4 et ING5 (Saha et al., 2010). Les protéines ING ont la capacité d'induire l'apoptose dépendante de p53 en réponse aux

dommages à l'ADN ou dans de multiples lignées de cellules cancéreuses par des mécanismes impliquant l'acétylation de p53 et l'inhibition de la dégradation de p53 par Mdm2 (Russell et al., 1998; Shiseki et al., 2003; Soliman and Riabowol, 2007). Saha et ses collègues ont montré que ING4 et ING5 interagissent toutes les deux avec le domaine N-Terminal d'EBNA-3C (acides aminés 129 à 200), déjà connu pour interagir avec p53 (Yi et al., 2009; Saha et al., 2010). De plus, EBNA-3C interagit sur la même région de ING4/5 que la protéine p53. Ainsi, EBNA-3C semble bloquer l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 induite par les protéines ING4/5 en faisant la compétition avec ces dernières pour p53.

Tous ces résultats suggèrent un rôle de la protéine EBNA-3C dans l'inhibition de la fonction de la protéine p53. Cependant, malgré toutes ces études, il n'est toujours pas compris pourquoi le niveau de la protéine p53 n'est pas affecté dans les LCL.

III. 2. 2. 2. L'oncoprotéine c-Myc

L'oncoprotéine c-Myc est, avec la protéine p53, une des protéines cellulaires les plus étudiées, cependant, les fonctions et les différentes régulations de c-Myc sont encore loin d'être comprises. La protéine c-Myc est connue pour son activité transcriptionnelle, à la fois activatrice et répressive, et agit sur des fonctions biologiques variées telles que la croissance cellulaire, l'apoptose, l'arrêt de la différenciation cellulaire, ou encore l'angiogenèse (Elend and Eilers, 1999; Pelengaris et al., 2000; Pelengaris and Khan, 2003; Herkert and Eilers, 2010). Il n'est donc pas surprenant de retrouver la protéine c-Myc sur-exprimée dans un très grand nombre de cancers, dont le lymphome de Burkitt dans lequel une translocation chromosomique permet une expression constitutive de l'oncogène c-Myc (Bornkamm, 2009).

Les protéines EBNA3 sont connues pour avoir un rôle indirect sur la transcription du gène *c-myc*. En effet, la protéine virale EBNA-2, en interagissant avec RBP-Jk, est recrutée au niveau du promoteur du gène *c-myc* et active sa transcription (Kaiser et al., 1999). Comme nous l'avons vu précédemment, les EBNA3 sont capables d'inhiber l'activité transactivatrice d'EBNA-2, et donc indirectement d'inhiber la transcription de *c-myc*. En effet, la sur-expression de la protéine EBNA-3A dans des lignées lymphoblastoïdes inhibe l'expression de *c-myc* et entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ (Cooper et al., 2003). Cet effet est dépendant de l'interaction d'EBNA-3A avec RBP-Jk puisqu'un mutant d'EBNA-3A ne pouvant plus interagir avec RBP-Jk ne peut plus réprimer l'expression de *c-myc*. Pourtant,

l'utilisation de lignées de LCL exprimant une protéine EBNA-3A active de manière conditionnelle (protéine de fusion EBNA-3AHT) ne montre aucun changement de niveau d'expression de l'oncoprotéine c-Myc lorsqu'EBNA-3A est inactivée (Maruo et al., 2003). Cependant, cette inactivation est associée à un arrêt des cellules et à une mort par apoptose. Il a donc été suggéré qu'une des fonctions d'EBNA-3A serait de protéger la cellule des effets pro-apoptotiques dus à l'oncoprotéine c-Myc.

De manière intéressante, la protéine EBNA-3C interagit *in vitro* et *in vivo* avec l'oncoprotéine c-Myc (Bajaj et al., 2008). La région d'EBNA-3C impliquée dans cette interaction est la région située entre les acides aminés 130 à 190, région interagissant avec le complexe Skp2. La protéine Skp2 est connue pour interagir et réguler l'oncoprotéine c-Myc (Jin and Harper, 2003; Kim et al., 2003; von der Lehr et al., 2003) : alors que la mono-ubiquitination de l'oncoprotéine c-Myc par Skp2 augmente l'activité transactivatrice de c-Myc, sa poly-ubiquitination entraîne sa dégradation (Vervoorts et al., 2006). De plus, Bajaj et ses collègues ont démontré par des expériences de pulse-chase que la protéine EBNA-3C stabilise l'oncoprotéine c-Myc (Bajaj et al., 2008). Enfin, la protéine EBNA-3C augmente la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur contenant des sites de fixation pour c-Myc. Bien que le mécanisme exact de cette régulation par EBNA-3C ne soit toujours pas connu, il est spéculé qu'EBNA-3C facilite le recrutement et l'interaction de c-Myc et de son co-activateur Skp2 menant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de c-Myc (Bajaj et al., 2008).

IV. Les protéines EBNA3 *in vivo*

Les protéines de la famille EBNA3 sont exprimées lors de la latence de type III durant l'infection par EBV. *In vitro*, ce programme de latence permet l'immortalisation de cellules B. *In vivo*, ce programme de latence est associé aux premiers stades de l'infection de cellules B naïves par EBV et est retrouvé dans les lymphomes associés au SIDA ainsi que dans les lymphoproliférations chez les post-transplantés (Thompson and Kurzrock, 2004). Par ailleurs, alors que classiquement le profil d'expression viral trouvé dans le lymphome de Burkitt était une latence de type I, l'étude du profil transcriptomique viral d'un grand nombre de biopsies de BL endémique ainsi que des lignées cellulaires de BL fraîchement établies, a récemment permis de mettre en évidence une nouvelle forme de latence dans environ 20% des BL endémiques (Kelly et al., 2002, 2005). Ce nouveau programme de latence est associé à une délétion du gène codant la protéine EBNA2, à une transcription initiée à partir du promoteur

Wp (et non Qp) et à l'expression, en plus de la protéine EBNA1, d'une protéine EBNA-LP tronquée, de BHRF-1 ainsi que des protéines EBNA3. Les protéines EBNA3 peuvent donc aussi être retrouvées dans certains lymphomes de Burkitt et apportent un avantage sélectif à ces cellules en inhibant la mort par apoptose induite par la dérégulation du gène *c-myc* (Anderton et al., 2007). Il a notamment été montré que les protéines EBNA-3A et EBNA-3C coopèrent pour l'inhibition de l'expression du gène pro-apoptotique *bim* (voir § II. 2. 2. 2). L'inhibition de la voie apoptotique induite par l'oncoprotéine c-Myc est une étape essentielle pour la formation de lymphomes associés à c-Myc (Dang et al., 2005; Hemann et al., 2005). Il n'est donc pas rare de retrouver l'oncoprotéine c-Myc mutée dans ces lymphomes. Il a notamment été montré que certains lymphomes de Burkitt expriment une protéine c-Myc mutée, ne pouvant plus activer l'apoptose car n'étant plus capable d'induire le gène *bim* (Hemann et al., 2005). Il a donc été suggéré qu'EBV, grâce à l'action d'EBNA-3A et -3C, pourrait contribuer à la formation de BL en inhibant le gène *bim*, créant ainsi un environnement cellulaire dans lequel la sur-expression de c-Myc serait tolérée et n'induirait pas l'apoptose (Anderton et al., 2007). Enfin, il a été montré que la protéine EBNA-3B est capable de protéger les cellules de BL de la mort par apoptose induite par l'absence de sérum et que cet avantage est associé à une augmentation de l'expression de l'oncoprotéine BCL2, un répresseur de la mort cellulaire (Silins and Sculley, 1995).

Tout ceci peut alors expliquer la pression de sélection conduisant à l'expression des protéines EBNA3 dans certains lymphomes de Burkitt, malgré une réponse forte du système immunitaire contre ces protéines virales. En effet, la primo-infection par EBV induit une forte réponse des lymphocytes T contre les antigènes viraux. Cette réponse est dominée par des LT CD8⁺ et est principalement dirigée contre les protéines EBNA3 (Murray et al., 1992; Steven et al., 1996; Hislop et al., 2007). Les EBNA3 sont donc des protéines fortement immunogènes. Un mécanisme par lequel on peut malgré cela retrouver les protéines EBNA3 exprimées dans certains lymphomes de Burkitt a été récemment suggéré. En effet, il a été montré que les BL de type I (exprimant uniquement EBNA1), contrairement aux LCL, ne sont pas capables de présenter, aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺, des antigènes par le CMH de classe I (Rowe et al., 2005). Cette déficience de présentation d'antigène est maintenue dans les BL exprimant les protéines EBNA3 (Kelly et al., 2002), expliquant alors pourquoi ces cellules ne sont pas reconnues par les LT CD8⁺ spécifique des protéines EBNA3.

V. Conclusion

L'immortalisation *in vitro* des cellules B par EBV nécessite la coopération de six protéines virales. Parmi elles, EBNA-3A et -3C sont des protéines apparentées qui ont à la fois des fonctions redondantes et spécifiques puisqu'elles ne peuvent pas se transcomplémenter. La plupart des études ont porté sur EBNA-3C et il n'a pas pour l'instant été possible d'associer une fonction particulière à EBNA-3C ou -3A qui pourrait rendre compte de leur spécificité lors du processus d'immortalisation. Seules des études systématiques menées en parallèle avec les trois EBNA3 permettraient d'identifier de telles fonctions.

Nous avons vu que les EBNA3 sont en premier lieu des régulateurs de la transcription. Ainsi, les trois protéines EBNA3 s'associent à la protéine RBP-J κ , un répresseur transcriptionnel qui interagit avec l'ADN de manière séquence spécifique. *In vitro*, l'interaction de l'un ou l'autre des EBNA3 avec RBP-J κ inhibe son interaction avec l'ADN. Plus récemment, il a été montré qu'EBNA-3C interagit avec p53 et que cette interaction résulte en une inhibition de la fixation de p53 sur l'ADN. Les autres mécanismes moléculaires mis en jeu par les protéines EBNA3 dans la régulation de la transcription ont été plus particulièrement étudiés dans le cas d'EBNA-3C pour laquelle il a été décrit des interactions avec des protéines cellulaires aux fonctions antagonistes (HDAC, HAT...). Cette variété de partenaires permet d'expliquer les résultats de la littérature qui présentent les EBNA3 tantôt comme activateurs tantôt comme répresseurs de la transcription. Le contexte cellulaire apparaît donc comme très important et va probablement influencer fortement sur la composition des complexes protéiques associés à EBNA-3C et déterminer à la fois les cibles et l'effet d'EBNA-3C sur ses cibles. La présence des autres protéines virales va probablement être aussi un facteur important de modulation de la régulation de la transcription par les EBNA3 (coopération avec EBNA2, induction par LMP1 de voies de signalisation conduisant à l'activation de AP1, NF κ B...).

Les EBNA3 sont aussi impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire en interagissant directement avec plusieurs régulateurs majeurs du cycle cellulaire (pRB, E2F1, cyclines A et D1) et en régulant leur dégradation par le protéasome. Ici encore, la plupart des études se sont concentrées sur la protéine EBNA-3C et il serait intéressant de savoir si ces fonctions dans le cycle cellulaires sont spécifiques à EBNA-3C ou partagées par les trois

protéines EBNA3. Un début de réponse peut être donné au regard du domaine d'interaction de ces partenaires cellulaires sur EBNA-3C. En effet, ces protéines interagissent toutes avec le domaine N-Terminal d'EBNA-3C au niveau de la région d'homologie entre les protéines EBNA3. On peut donc supposer qu'EBNA-3A et EBNA-3B interagissent aussi avec ces facteurs cellulaires.

Enfin, nous avons vu qu'EBNA-3A et 3C participent à l'immortalisation des cellules B *in vitro*, mais quel est leur rôle au cours de l'infection par EBV *in vivo* ? Le modèle actuel est que l'infection par EBV de cellules B au niveau de l'épithélium oropharyngé mime l'interaction avec un antigène. L'expression des gènes de latence III va induire la prolifération et la migration des cellules vers les follicules. Puis, le programme d'expression viral se limite à l'expression des seules protéines EBNA1, LMP1 et LMP2A au sein de centres germinatifs, ce qui va conduire à la maturation en cellules B mémoires, réservoir du virus. Dans ce modèle, les protéines EBNA-3 jouent probablement un rôle essentiel dans la première phase d'expansion des cellules, ce qui est parfaitement en accord avec leurs fonctions *in vitro*, en particulier sur le cycle cellulaire. La protéine EBNA-3B, qui n'est pas requise *in vitro* pour l'immortalisation des cellules B, est probablement nécessaire *in vivo* puisqu'elle est conservée dans toutes les souches virales connues. Il a récemment été suggéré que la protéine EBNA-3B serait une protéine suppresseur de tumeur (White et al., 2012). En effet, l'absence du gène codant pour EBNA-3B entraîne une augmentation du potentiel oncogénique d'EBV.

Malgré l'abondance de données de la littérature, la fonction des protéines EBNA3 est encore loin d'être comprise. Mieux appréhender leurs différents rôles est un prérequis pour mieux comprendre la biologie de l'infection par EBV ainsi que la participation du virus au développement de pathologies cancéreuses en particulier chez les individus immunodéprimés. L'action des protéines EBNA3 sur le dérèglement du cycle cellulaire passe par des interactions spécifiques avec des protéines cellulaires. L'identification de ces protéines cellulaires devrait nous permettre de mieux comprendre la fonction des protéines EBNA3.

Chapitre II : Résultats et discussion

I. Recherche de nouveaux partenaires cellulaires pour les protéines EBNA3

Afin de mieux comprendre l'action des protéines virales EBNA3 au niveau moléculaire, notre laboratoire a entrepris, en collaboration avec l'équipe I-MAP (Infection MAPping), l'étude des réseaux d'interactions protéiques mis en place par les protéines EBNA3 au cours de la transformation de cellules B par le virus d'Epstein Barr. Ce projet avait pour but de cartographier les interactions entre protéines virales et cellulaires (interactome virus-hôte) par une approche de criblage à haut-débit en deux-hybrides (Y2H pour Yeast Two-Hybrid) chez *S. cerevisiae*. Lors de ma thèse, je me suis aussi intéressé à la caractérisation des partenaires cellulaires de la protéine virale EB2, protéine précoce du virus d'Epstein-Barr. Les résultats de l'étude avec EB2 sont disponibles en annexe de ma thèse.

I. 1. Le crible deux-hybrides

I. 1. 1. Principe du deux-hybrides en levure

Parmi tous les systèmes développés dans le but d'étudier les interactions protéines-protéines, un des plus performants est le système génétique dit "deux-hybrides" dans la levure (Fields and Song, 1989; Vidal and Legrain, 1999; Legrain and Selig, 2000). Ce système repose sur le fait que l'activité de nombreux facteurs activateurs de transcription eucaryotes dépend de deux domaines modulables : un domaine activateur de la transcription et un domaine de fixation à l'ADN (**Fig 14**). Le système deux-hybrides en levure comporte deux éléments : i) Tout d'abord un plasmide portant un gène codant pour une protéine appelée "appât". Celle-ci est constituée d'une protéine X (codée à partir de nos ORF virales) fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4. Une séquence NLS contenue dans ce domaine de liaison permet aux protéines d'être importées dans le noyau. Ce plasmide possède de plus un gène de sélection permettant la croissance des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) sur un milieu sans tryptophane. ii) un deuxième plasmide portant un gène codant pour une protéine appelée "proie". Celle-ci est constituée d'une protéine Y (codée à partir d'ADNc issus d'une banque) fusionnée avec le domaine activateur du facteur de transcription GAL4 et une séquence NLS. Ce plasmide possède de plus un gène de sélection permettant aux levures transformées d'être isolées sur un milieu sans leucine.

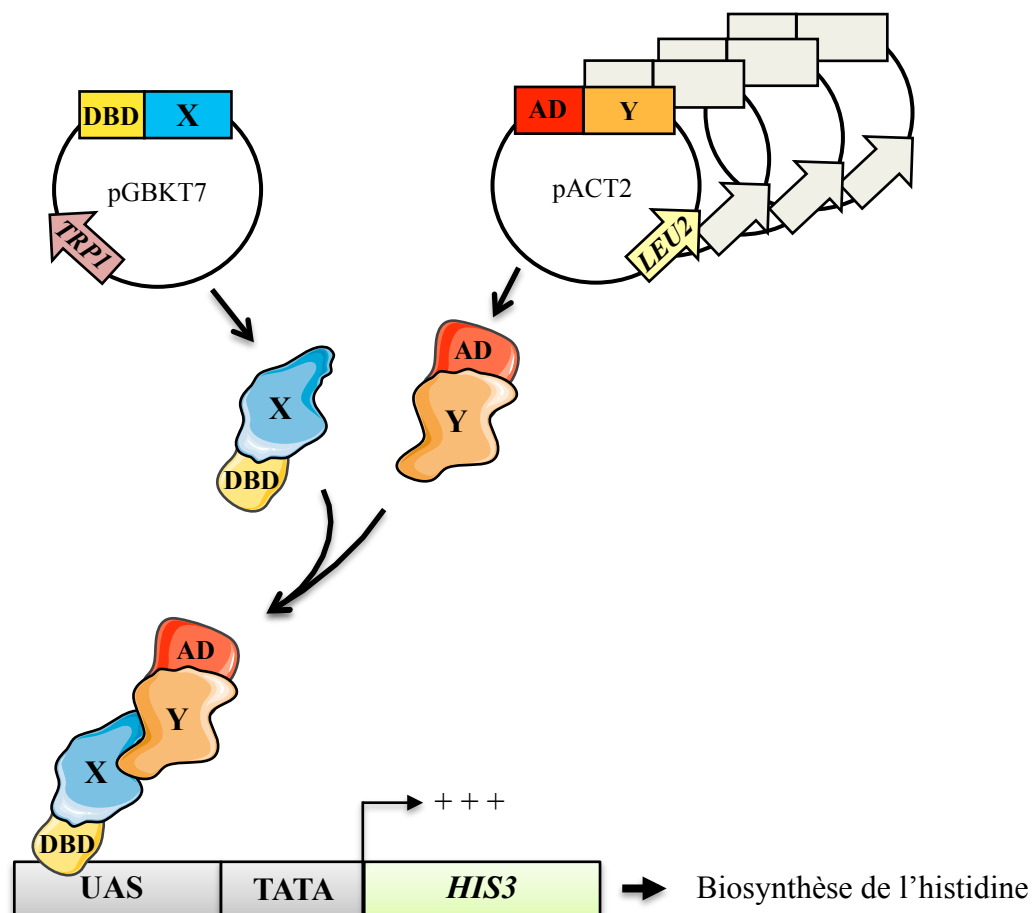


Figure 14. Principe du système deux-hybrides.

Le plasmide appât (pGBKT7) exprime une protéine X fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (DBD pour DNA Binding Domain), domaine interagissant avec la séquence UAS (Upstream Activation Sequence). La banque de plasmides proies codent pour des protéines Y fusionnées au domaine activateur de la transcription de GAL4 (AD pour Activation Domain). Si X et Y interagissent, l'intégrité fonctionnelle du facteur de transcription GAL4 est restaurée et le gène rapporteur *HIS3* est exprimé, permettant aux levures de pousser sur un milieu déplété en histidine.

Chacun des deux plasmides est transfecté dans des levures haploïdes mutées pour le gène *HIS3* (impliqué dans la biosynthèse de l'histidine) et de types sexuels différents. Ainsi, la souche AH109 (MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, GAL4 Δ , gal80 Δ , LYS ::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 ::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1) a été transformée avec les différents plasmides d'expression codant pour les protéines virales appâts et la souche Y187 (MAT α , ure-3-52, his3-200, ade2-101,

trp1-901, leu2-3, GAL4Δ, met-, gal80Δ, MEL1, URA3 ::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ) a été transformée par la banque de plasmides porteurs d'ADNc. De plus, les levures haploïdes AH109 (transformées par les plasmides appâts) possèdent le gène rapporteur *HIS3* sous le contrôle du promoteur du gène *GAL1* (la protéine GAL4 active la transcription du gène *GAL1*).

Le système va reposer sur la capacité qu'ont les deux protéines de fusion à activer la transcription de gènes rapporteurs dans la levure. Quand les deux protéines hybrides interagissent dans la cellule, l'intégrité fonctionnelle de GAL4 est alors restaurée ce qui permet la transcription du gène rapporteur. Seules les cellules diploïdes, obtenues après croisement des levures haploïdes, dans lesquelles les protéines de fusion X et Y interagissent seront capables d'activer le gène rapporteur *HIS3* et de pousser sur un milieu sans histidine.

I. 1. 2. Construction des plasmides appâts

Afin de construire les différents vecteurs qui ont été utilisés pour le crible deux-hybrides, nous avons choisi d'utiliser la méthode de clonage Gateway (**Fig 15**) (Hartley, 2000; Walhout et al., 2000). Cette méthode, reposant sur la recombinaison spécifique de sites du bactériophage λ, permet la recombinaison directionnelle d'un produit PCR (portant le gène d'intérêt et deux sites de recombinaison attB ajoutés grâce aux amorces de PCR) et d'un vecteur donneur (portant deux sites attP) grâce à une réaction de recombinaison dite «BP». Le produit de cette première recombinaison, appelé vecteur d'entrée, sert de matrice à une seconde recombinaison (dite «LR») avec un vecteur de destination (portant deux sites de recombinaison attR) pour obtenir un vecteur d'expression. L'utilisation de différents gènes de résistance aux antibiotiques pour les deux étapes permet une sélection positive. De plus, les différents plasmides utilisés dans la technique Gateway contiennent, à la place de l'ORF à cloner, le gène toxique *ccdB*, qui élimine les bactéries transformées par des plasmides non recombinants.

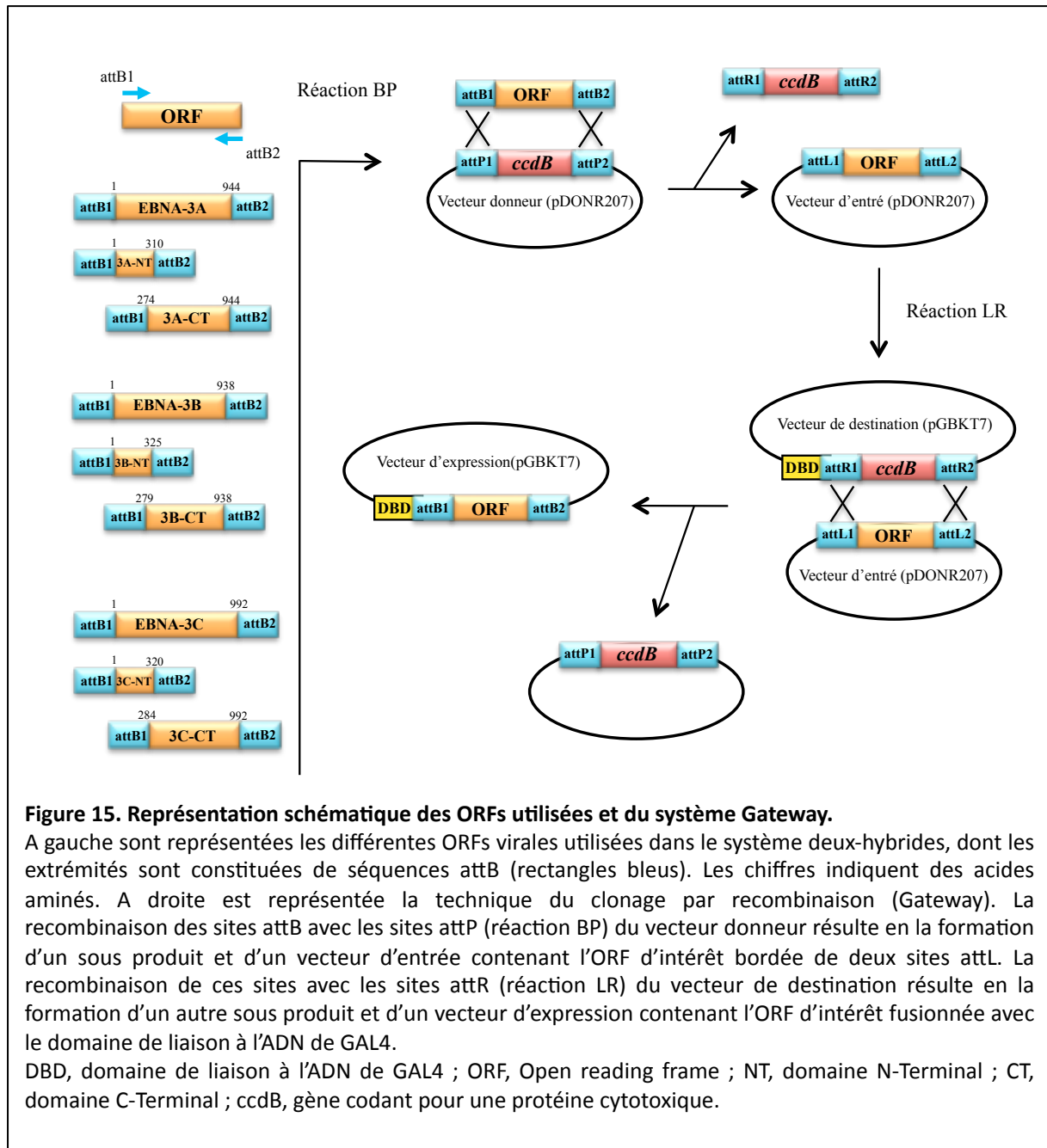
Afin de chercher les interacteurs potentiels des protéines appâts EBNA-3A, -3B et -3C, les ORF codant pour ces protéines virales ont été amplifiées par PCR puis clonées dans le plasmide pDONR207. De plus, les domaines N- et C-Terminaux des différentes protéines EBNA3 ont aussi été amplifiés, puis clonés dans le plasmide pDONR207 (**Tableau 1**).

Protéine virale	Domaine N-Terminal	Domaine C-Terminal
EBNA-3A	1-310	274-944
EBNA-3B	1-325	279-938
EBNA-3C	1-320	284-992

Tableau 1. Les différents domaines N et C-Terminaux des EBNA3 utilisés lors des cribles deux-hybrides. (Les chiffres représentent la position des acides aminés).

Une fois construits, les différents plasmides pDONR207 ont été utilisés pour cloner les ORF virales dans le plasmide d'expression pGBKT7 (contenant le domaine de liaison à l'ADN de GAL4) (**Fig 15**). Entre chaque clonage, les ORF clonées ont été séquencées et comparées aux séquences de référence pour s'assurer de l'absence de mutation dans les futures protéines utilisées en deux-hybrides.

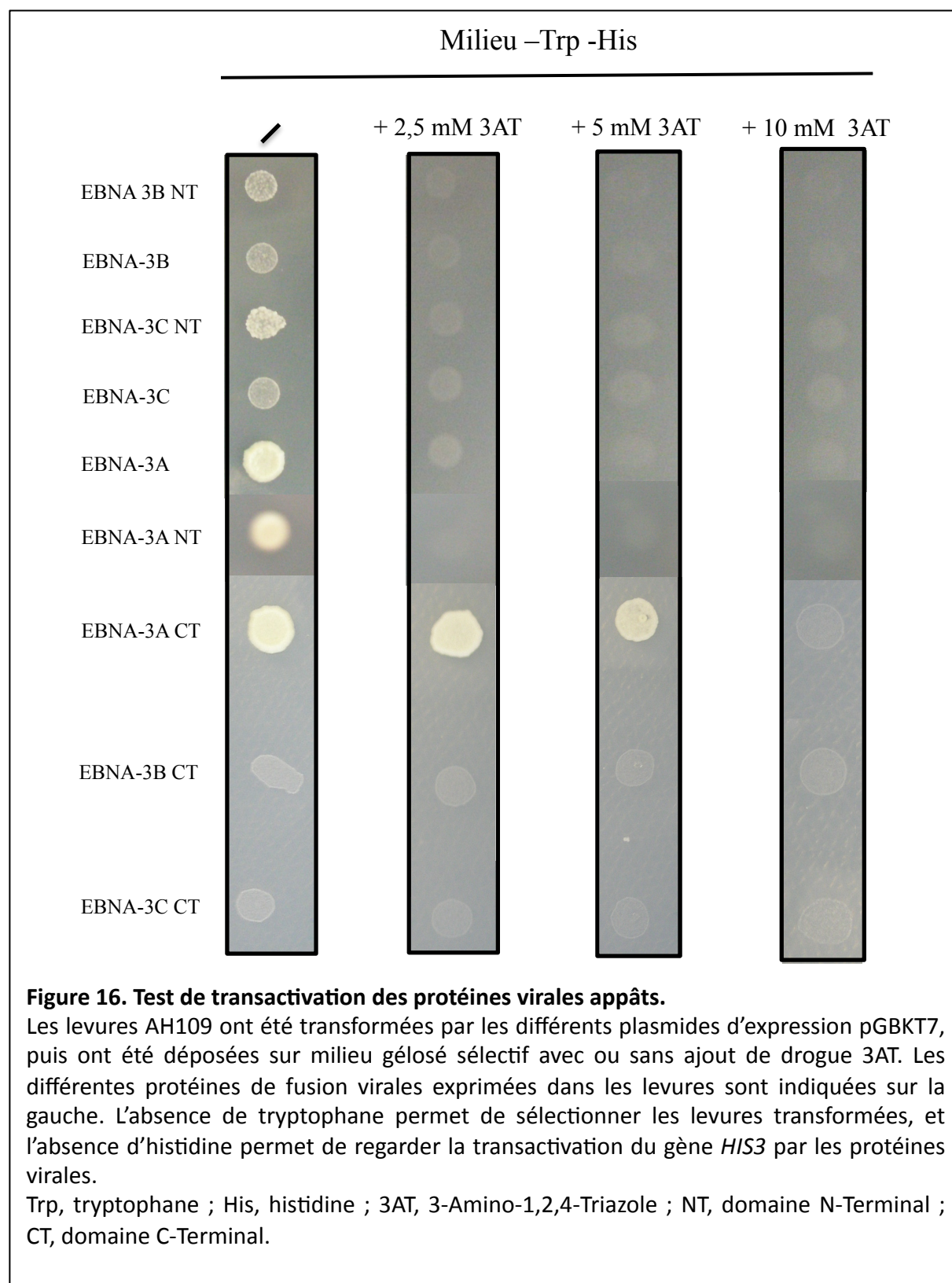
Avant de démarrer le crible, nous avons vérifié que nos protéines virales ne pouvaient pas induire à elles seules la transcription du gène rapporteur du système deux-hybrides ce qui aurait pour effet de générer des faux positifs. En effet, même s'il a été montré que les EBNA3 entières, en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4, étaient des répresseurs de transcription dans un système mammifère, il a aussi été montré que certains domaines de ces protéines peuvent activer la transcription (Marshall and Sample, 1995; Waltzer et al., 1995; Bain et al., 1996; Bourillot et al., 1998). Il est donc très important de vérifier que ces protéines n'activent pas le gène *HIS3* dans la levure. Pour éviter ce problème, nous avons utilisé le 3-Amino-1,2,4-Triazole (3AT). Ce composé est un inhibiteur du métabolisme de l'histidine permettant ainsi de réduire une transactivation éventuelle. Il s'avère que la plupart de nos protéines de fusions sont capables d'induire l'expression du gène *HIS3* (**Fig 16**), les protéines EBNA-3A et EBNA-3A N-Terminal et C-Terminal transactivant le plus. Cependant, dès l'ajout de 2,5 mM de 3AT, cette transactivation est inhibée pour toutes les protéines de fusion exceptée pour le mutant EBNA-3A C-Terminal pour lequel il nous a fallu augmenter la concentration jusqu'à 10 mM de 3AT. Malheureusement, aucun crible n'a pu être effectué avec la protéine EBNA-3A-CT, car les levures transformées par ce plasmide d'expression n'ont jamais poussé en milieu liquide. Afin d'être sûr d'observer uniquement les interactions spécifiques nous avons donc décidé d'utiliser 5 mM de 3AT pour chacun des cribles.



I. 1. 3. Construction de la banque de plasmides proies

Afin de travailler au plus proche de la situation d'infection *in vivo*, nous avons décidé de cribler nos protéines appâts contre une banque d'ADNc de LCL établie au laboratoire par infection de lymphocytes B primaires humains par le virus d'Epstein-Barr. Pour cela, les ARNm issus de LCL ont été isolés et envoyés à la société Invitrogen qui a ensuite construit la

banque. Cette banque contient sous forme plasmidique (pACT2) des ADNc fusionnés au domaine d'activation de la transcription de GAL4.



I. 1. 4. Crible deux-hybrides en levures

Les premiers cribles ont été effectués avec les protéines appâts EBNA3 entières. Pour chaque crible, les levures ont été étalées sur 10 boîtes de milieu SD dépourvu de leucine, histidine, tryptophane et additionnée de 5 mM de 3AT (1 crible étant effectué avec un plasmide appât contre la banque d'ADNc). Après avoir sélectionné les colonies positives, des PCR sur colonies ont été effectuées afin d'amplifier les différents ADNc codant pour les interacteurs potentiels de nos protéines virales. Chaque produit PCR a ensuite été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose et a été envoyé à séquencer. Puis, les séquences obtenues ont été analysées par Blast. Les résultats de ce premier crible deux-hybrides pour les différentes EBNA3 se sont avérés être assez inattendus. En effet, sur 289 produit de PCR envoyés à séquencer, 223 sont des séquences codantes pour la protéine RBP-Jκ et 4 autres sont des séquences correspondantes aux protéines CtBP1, MED25, PPIG, et RPL-12. Ainsi, plus de 77% des ADNc séquencés codaient pour la protéine RBP-Jκ, protéine déjà connue pour interagir avec les 3 protéines de la famille EBNA3. Ce résultat est probablement dû au fait que l'ADNc codant pour la protéine RBP-Jκ est fortement représenté dans notre banque et que l'affinité entre les EBNA3 et RBP-Jκ est très forte.

Nous avons alors décidé de recommencer une série de crible deux-hybrides en rajoutant une étape pour éliminer les clones RBP-Jκ. Après avoir sélectionné les colonies positives, des PCR sur colonies ont été effectuées et chaque produit PCR a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose. Cependant, avant d'envoyer les produits de PCR à séquencer nous avons vérifié que ces séquences d'ADNc ne correspondaient pas aux séquences codantes pour la protéine RBP-Jκ. Pour cela, une PCR a été effectuée sur ces différents produits en utilisant des amorces spécifiques pour RBP-Jκ. Sur 290 produits PCR testés, 246 correspondaient à RBP-Jκ. Nous avons donc envoyé les 44 produits PCR restants à séquencer.

Au final, sur tous les cribles effectués avec notre banque d'ADNc de LCL nous avons analysés 579 produits PCR dont 469 correspondaient à la protéine RBP-Jκ, soit plus de 80%. Afin de contourner ce biais, nous avons alors effectué une série de crible deux-hybrides en utilisant une autre banque d'ADNc que notre banque provenant de LCL. Nous avons choisi d'utiliser une banque normalisée d'ADNc provenant de rate humaine. Cette banque était déjà disponible dans l'équipe I-MAP. Les différents cribles effectués en utilisant cette nouvelle

banque nous ont permis d'isoler 112 produits PCR dont seulement 6 correspondaient à RBP-Jk (soit 5%). Les 106 produits PCR ne correspondant pas à RBP-Jk ont ensuite été envoyés à séquencer. Les cribles effectués avec la banque de rate ont été très enrichissants. En effet, sur les 106 produits PCR envoyés au séquençage, 22 ADNc codent pour différents partenaires potentiels des EBNA3, autres que RBP-Jk. De plus, 15 séquences correspondent parfaitement avec des séquences ADN du génome humain mais ces séquences sont pour le moment inconnues et 1 séquence correspond à NEAT1, un ARN non codant. De manière intéressante, certains partenaires cellulaires ont été identifiés avec la protéine appât entière ainsi que la partie N- ou C-Terminale, nous donnant d'ores et déjà une indication sur la localisation de la région d'interaction avec le partenaire cellulaire. C'est le cas notamment de la protéine DNAJB1 qui a été identifiée comme un interactant de la protéine EBNA-3A ainsi que de EBNA-3A NT. De plus, certains partenaires cellulaires identifiés grâce à la banque de rate, ont aussi été identifiés grâce aux cribles effectués avec la banque de LCL. Enfin, il est important de souligner qu'un crible deux-hybrides n'est pas exhaustif. Ceci explique pourquoi certains partenaires des EBNA3 ont été identifiés avec leurs parties N- ou C-Terminales et pas avec la protéine entière.

Les différents résultats de tous les cribles en fonction des protéines appâts sont résumés dans le **tableau 2**.

I. 2. Validation des différents partenaires cellulaires identifiés

La deuxième étape après un crible deux-hybrides est la validation des partenaires identifiés, dans un autre système que le deux-hybrides. Cette étape permet notamment d'éliminer les faux positifs, c'est à dire les partenaires qui auraient pu activer seuls l'activation du gène rapporteur. Nous avons choisi de valider les différentes interactions potentielles par le système de Co-ImmunoPrécipitation (Co-IP) en cellules humaines. De plus, nous avons voulu valider les partenaires cellulaires non seulement pour la protéine de la famille EBNA3 avec laquelle ils avaient été identifiés mais aussi avec les autres protéines de la famille.

Protéine Appât	Protéine proie	Nombre de hit	Banque utilisée
EBNA-3A	RBP-Jκ	247	LCL (244) / Rate (3)
	CtBP1	13	LCL (2) / Rate (11)
	DNAJB1	6	Rate
	CtBP2	2	Rate
	PPP5C	2	Rate
	NF-YC	2	LCL (1) / Rate (1)
	TRAPPC6A	1	LCL
	MED25	1	LCL
	IGHG1	1	Rate
	ARRB2	1	Rate
	NEAT1 (non coding RNA)	1	Rate
	MEOX1	1	Rate
	HOP	1	Rate
	GLUL	1	Rate
	Inconnus	14	Rate
EBNA-3A NT	SNAPAP	2	LCL
	COPS5	1	LCL
	RPL15	1	LCL
	IPO5	1	LCL
	STAG3L1	1	Rate
	DNAJB1	1	Rate
EBNA-3B	RBP-Jκ	136	LCL (135) / Rate (1)
	ZYX	6	Rate
	Miz-1	5	Rate
	CENPJ	2	Rate
	SIAH1	1	Rate
	Inconnu	1	Rate
EBNA-3B-CT	ZYX	5	Rate
	CENPJ	3	LCL (1) / Rate (2)
	Inconnu	1	Rate
EBNA-3C	RBP-Jκ	92	LCL (90) / Rate (2)
	DRO1	3	Rate
	COL1A2	2	Rate
	RPL-12	1	LCL
	PPIG	1	LCL
	SCL25A3	1	LCL
	Eif3F	1	LCL
	MYO1F	1	Rate
	CtBP1	1	Rate
	FBXO18	1	Rate
EBNA-3C-NT	SNAPAP	1	LCL
	COPS5	3	LCL
	FBXO18	4	Rate
	PSMA7	1	Rate
	HNRNPK	1	Rate
EBNA-3C-CT	CtBP1	11	LCL (7) / Rate (4)
	SUMO2	3	LCL
	DRO1	1	Rate
	PDLIM7	1	Rate
	IGHG1	1	Rate
	Miz-1	1	Rate
	MYO1F	1	Rate
	ACTG1	1	Rate
	MCRS1	1	Rate
	CENPJ	1	Rate

Tableau 2. Résultats des cribles deux-hybrides en levure pour les protéines EBNA3.

I. 2. 1. Les partenaires déjà connus dans la littérature

Les différents cribles que nous avons effectués nous ont permis d'identifier 36 partenaires pour les protéines virales EBNA3. Parmi ces partenaires cellulaires, 6 étaient déjà connus dans la littérature pour interagir avec l'une ou l'autre des protéines EBNA3.

Certains sont très largement caractérisés, c'est le cas notamment de la protéine RBP-Jκ (représentant plus de 68% des ADNc isolés), facteur de transcription interagissant avec les trois protéines EBNA3, ainsi que la protéine CtBP1, co-répresseur recruté par EBNA-3A et EBNA-3C. Ces deux partenaires étant déjà connus et caractérisés nous ne les avons pas validés en co-immunoprécipitation en cellules de humaines.

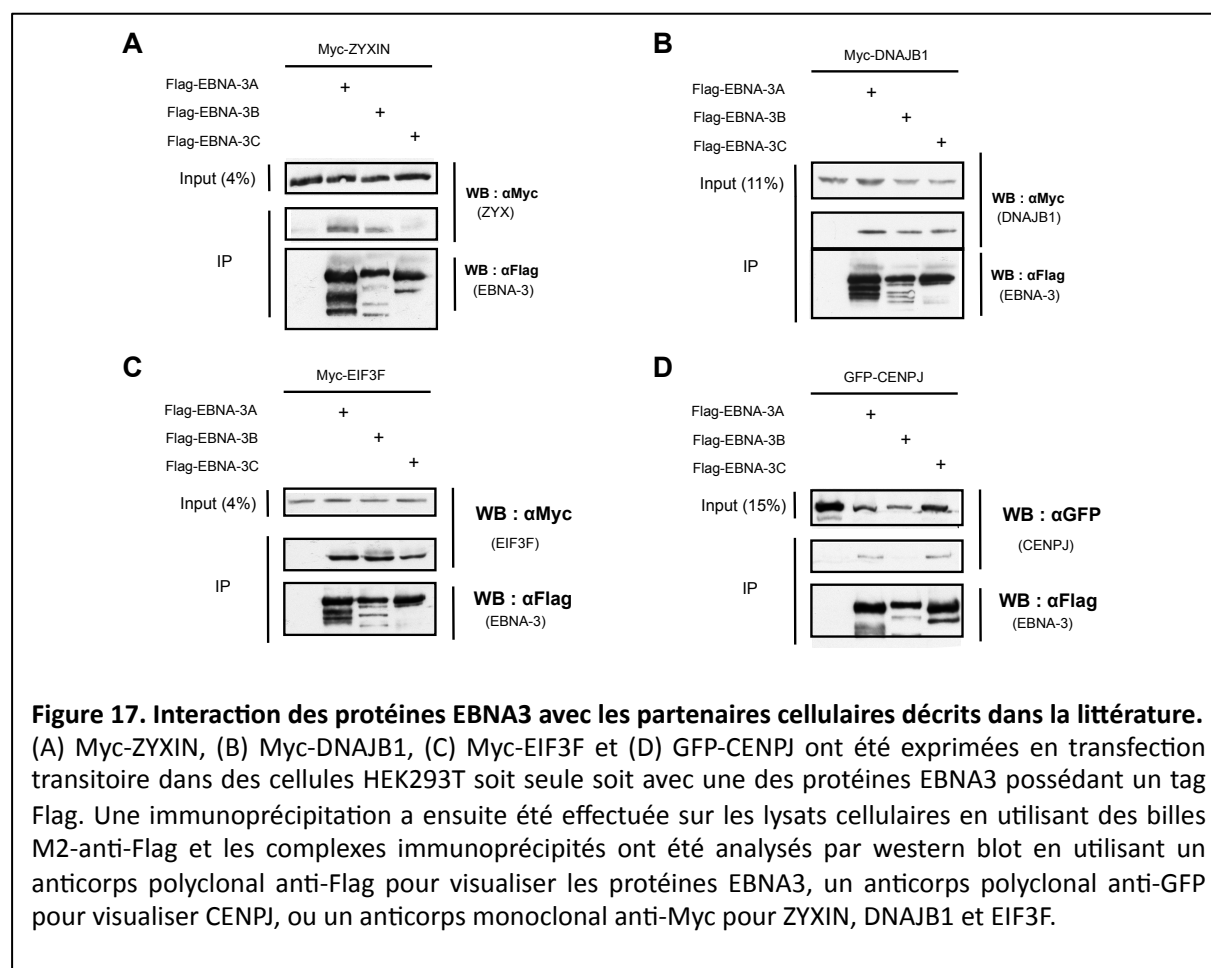
D'autres partenaires identifiés dans nos cribles deux-hybrides sont décrits dans la littérature mais leur interaction avec les EBNA3 n'est que peu ou pas caractérisée. La protéine chaperonne DNAJB1 par exemple a déjà été montrée comme interagissant avec EBNA-3A dans des expériences de co-immunoprécipitation dans des LCL (Young et al., 2008). Nous avons validé cette interaction non seulement pour EBNA-3A mais aussi pour les deux autres protéines de la famille EBNA3, -3B et -3C (**Fig 17B**). La protéine ZYXIN quant à elle, a été identifiée lors d'un crible deux-hybrides comme un partenaire potentiel de la protéine EBNA-3B (Calderwood et al., 2011). Nous avons aussi identifié la ZYXIN comme partenaire de la protéine EBNA-3B et nous avons validé cette protéine cellulaire comme interagissant avec EBNA-3A et -3B (**Fig 17A**). Enfin, CENPJ et EIF3F, sont deux protéines cellulaires qui ont été identifiées par crible deux-hybrides, comme interagissant avec la protéine virale EBNA-3C (Lin et al., 2002). Nous avons non seulement validé ces deux partenaires pour EBNA-3C, mais aussi pour la protéine EBNA-3A. En ce qui concerne EBNA-3B, cette dernière interagit en co-immunoprécipitation avec EIF3F mais pas avec CENPJ (**Fig 17C et 17D**).

I. 2. 2. Les nouveaux partenaires cellulaires des protéines EBNA3

Hormis ces 6 protéines déjà connues, nous avons identifié de nombreuses protéines qui n'avaient pas été décrites auparavant comme des interactants des EBNA3. De plus, une proportion importante de ces protéines cellulaires ont un lien direct avec une ou plusieurs des fonctions connues des EBNA3.

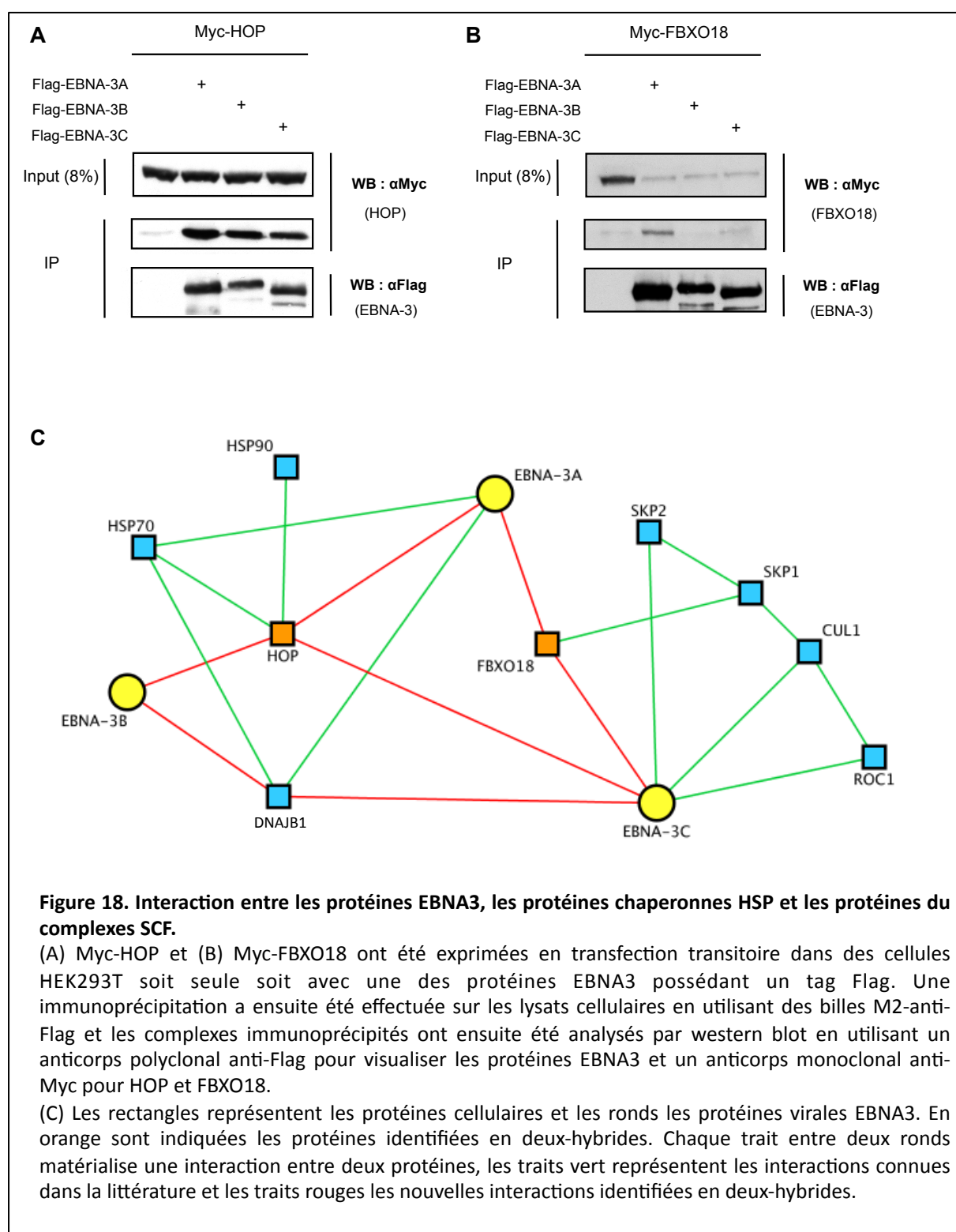
1. 2. 2. 1. Protéines chaperonnes et complexe SCF

Nous avons identifié des partenaires non précédemment identifiés pour les EBNA3, mais étant connus pour leur association avec des complexes protéiques qui eux avaient été caractérisés comme interagissant avec une des protéines EBNA3. C'est ainsi le cas de la protéine HOP (HSP70/HSP90 organizing protein, encore appelée STIP1), que nous avons identifiée avec EBNA-3A (et validée avec les trois protéines EBNA3, **Fig 18A**), et qui facilite l'association du complexe de chaperones HSP70/HSP90 (Chen et al., 1998; Johnson et al., 1998; Scheufler et al., 2000). De manière intéressante, il a déjà été montré que la protéine EBNA-3A interagit avec les protéines chaperonnes DNAJB1 et HSP70 (Young et al., 2008). Cependant le rôle de l'interaction de la protéine EBNA-3A avec les protéines chaperonnes est pour le moment inconnue.



Une deuxième protéine identifiée dans notre crible deux-hybrides est la protéine FBXO18 (F-box protein, helicase, 18), une protéine à boîte F qui forme un complexe SCF

avec les protéines SKP1, CUL1 et ROC1 en interagissant directement avec la protéine SKP1 (Kim et al., 2002; Kim, 2004). Le complexe SCF^{FBXO18} possède une activité ubiquitine E3 ligase responsable de l'ubiquitination de substrats spécifiques qui seront alors dégradés par le protéasome. Cependant, les protéines cibles de la protéine FBXO18 sont pour le moment inconnues. Enfin, la protéine FBXO18 possède également une activité de type hélicase et peut se fixer à l'ADN simple brin (Kim, 2004; Fugger et al., 2009).



De manière intéressante, il a été montré que la protéine EBNA-3C interagit directement avec les protéines SKP2, CUL1 et ROC1 (Knight et al., 2005a, 2005b). De par son interaction avec le complexe SCF^{SKP2}, il est connu qu'EBNA-3C régule la stabilité de certaines protéines. Grâce à nos cribles deux-hybrides nous avons identifié FBXO18 avec la protéine EBNA-3C et validé par co-immunoprécipitation l'interaction avec EBNA-3A et -3C (**Fig 18B**). Bien que la Co-IP pour EBNA-3C ne soit pas aussi forte que pour EBNA-3A on peut clairement voir que FBXO18 est co-immunoprécipitée avec EBNA-3C et non avec EBNA-3B, alors que la quantité de protéine cellulaire (input) est la même. La protéine EBNA-3C pourrait donc cibler différents complexes SCF. Malheureusement, l'interaction d'EBNA-3A avec le complexe SCF^{SKP2} n'a jamais été regardée. Cependant, le fait que la protéine FBXO18 interagisse avec EBNA-3A laisse penser que cette protéine virale est elle aussi impliquée dans la régulation de la voie de l'ubiquitine par les complexes SCF. Les différentes interactions entre les protéines virales EBNA3 et les protéines chaperonnes ainsi que les protéines du complexe SCF sont résumées dans la **figure 18C**.

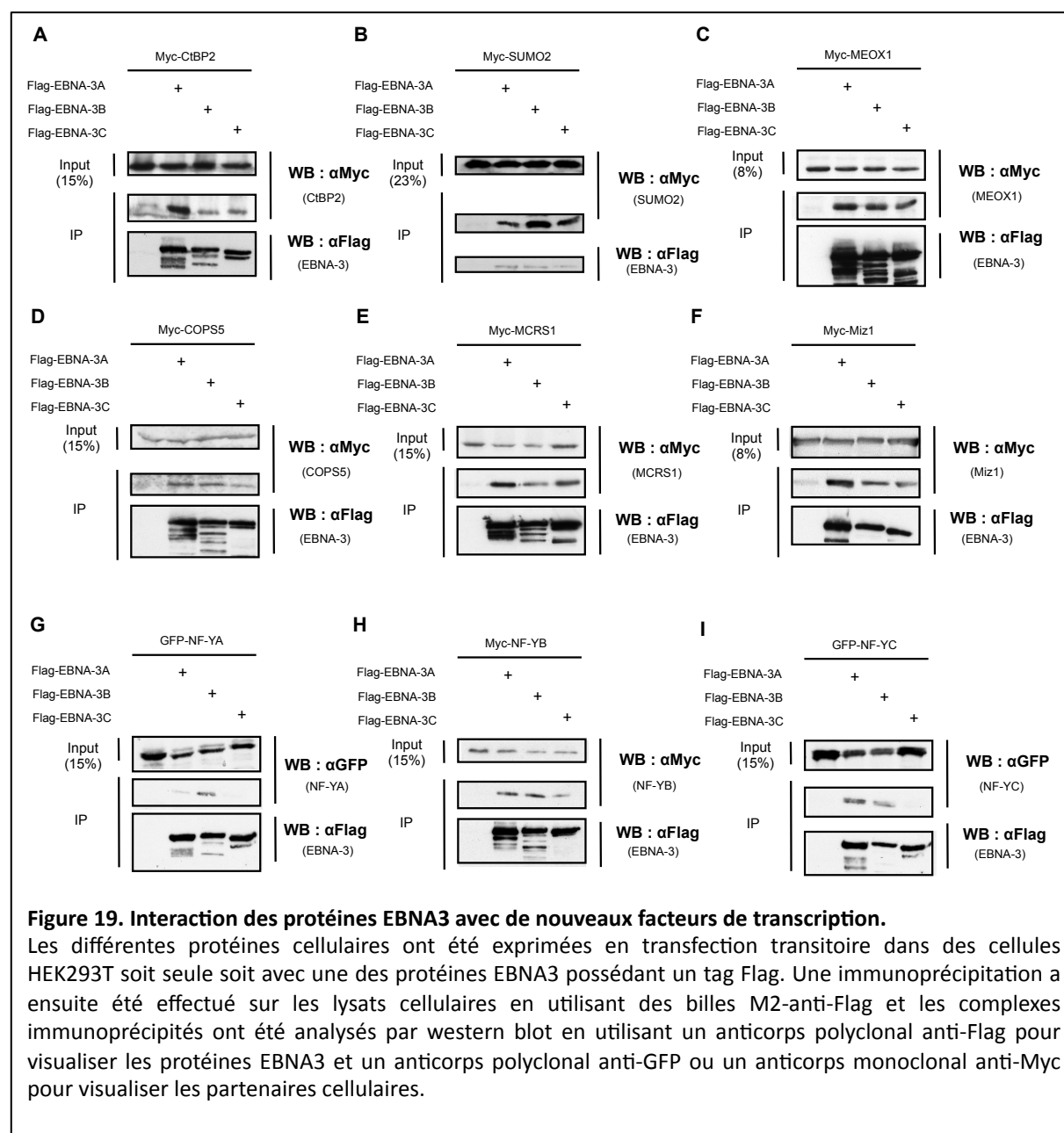
1. 2. 2. 2. Interaction des EBNA3 avec des facteurs de Transcription

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les protéines EBNA3 ont d'abord été caractérisées comme des régulateurs transcriptionnels (tantôt activateurs, tantôt répresseurs) ne fixant pas directement l'ADN. Les mécanismes par lesquels les EBNA3 pourraient interagir *in vivo* avec leurs promoteurs cibles sont pour le moment inconnus. Il est cependant connu que les protéines EBNA3 peuvent interagir avec différents facteurs de transcription qui eux fixent l'ADN. Il est de plus connu qu'une fois ciblées sur un promoteur donné les EBNA3 peuvent réguler la transcription en recrutant des co-activateurs comme p300 ou des co-répresseurs comme CtBP1.

Nous avons, lors de nos cribles deux-hybrides, identifié 7 protéines connues pour avoir un rôle dans la transcription. Nous avons tout d'abord identifié la protéine CtBP2 comme partenaire potentiel de la protéine EBNA-3A. Ce partenaire a ensuite été validé pour EBNA-3A, -3B et -3C en co-immunoprécipitation en cellules humaines (**Fig 19A**). CtBP1 et CtBP2 sont deux protéines possédant plus de 80 % d'homologies de séquences et ayant une distribution différente en fonctions des tissus (Katsanis and Fisher, 1998; Sewalt et al., 1999). La protéine CtBP2, recrutée par Mdm2, inhibe l'activité transcriptionnelle de la protéine p53

(Mirnezami et al., 2003). Les protéines EBNA3 seraient donc capables de recruter les deux protéines CtBP pour l'inhibition de la transcription.

Il est déjà connu que la protéine EBNA-3C interagit avec les protéines SUMO-1 et SUMO-3 et ces interactions sont essentielles pour l'activité co-activatrice de la protéine EBNA-3C (Lin et al., 2002). De plus, EBNA-3C est sumoylée par SUMO-2 et SUMO-3 mais pas par SUMO-1 (Rosendorff et al., 2004). De manière intéressante nous avons, lors de nos cribles deux-hybrides, identifié la protéine SUMO-2 comme interaguant potentiel d'EBNA-3C. Puis, nous avons validé ce partenaire pour les trois protéines de la famille EBNA3 (**Fig 19B**). L'interaction de la protéine SUMO-2 avec EBNA-3C n'est pas surprenante puisque SUMO-2 et SUMO-3 possèdent 97% d'identité protéique (Hay, 2005).



Nous avons aussi identifié comme partenaire potentiel d'EBNA-3A la protéine MEOX1 (mesenchyme homeobox 1), protéine à homéodomaine, connue pour avoir un rôle dans la régulation de la transcription. En particulier, il a récemment été montré que la protéine MEOX1 joue un rôle dans l'activation du gène *CDKN2A*, gène codant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire p16^{INK4A} (Douville et al., 2011). Bien que le mécanisme exact de cette activation ne soit pas connu, Douville et ses collègues ont montré que l'action de la protéine MEOX1 dépend de sa fixation sur le promoteur du gène *CDKN2A*. La protéine MEOX1 a été validée par Co-IP comme partenaire pour les trois EBNA3 (**Fig 19C**). Les protéines EBNA-3A et -3C étant capables de réprimer le gène *CDKN2A*, on peut donc penser que cette inhibition du promoteur du gène codant pour la protéine p16^{INK4A} puisse passer par l'interaction avec la protéine MEOX1.

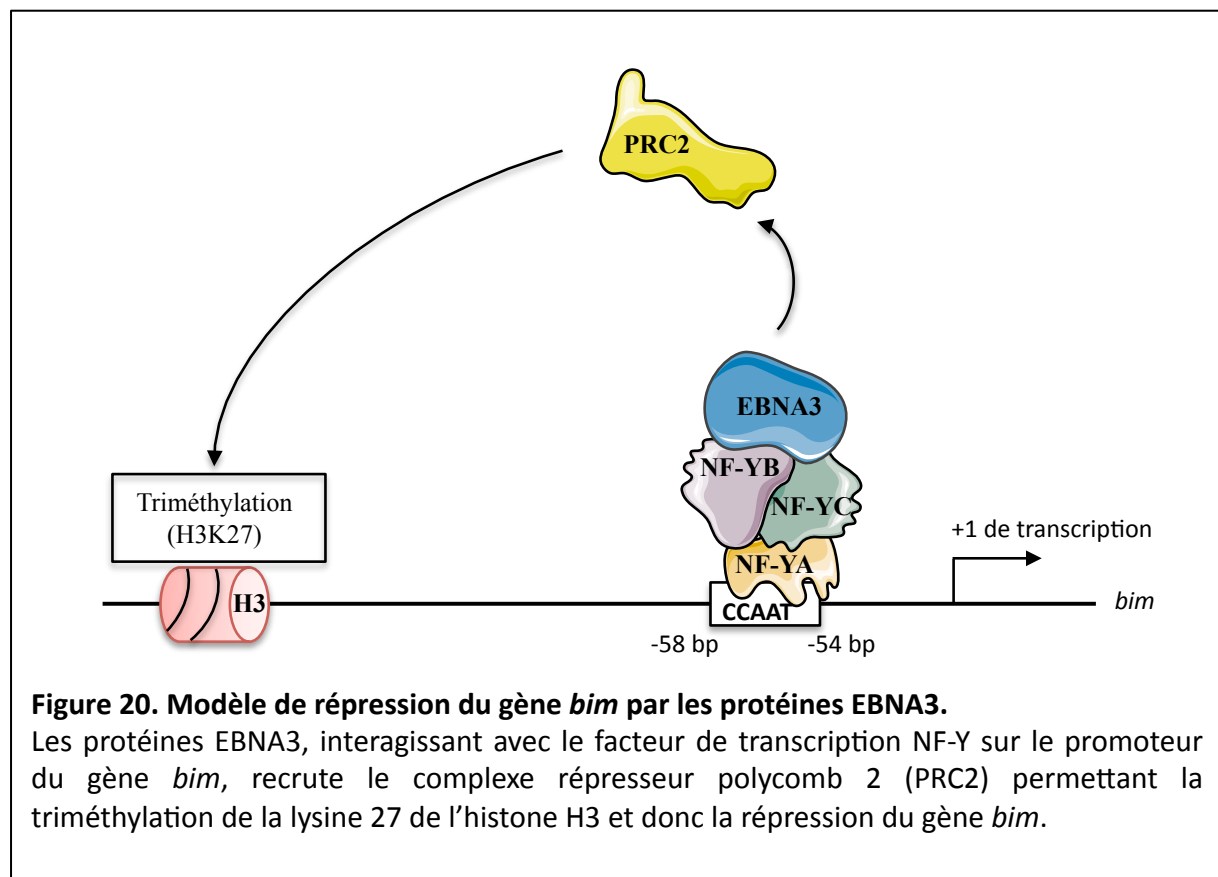
Un autre partenaire de la protéine EBNA-3A que nous avons identifié est la protéine cellulaire COPS5. La protéine COPS5 est une protéine multifonctionnelle originellement identifiée comme un partenaire et co-activateur des facteurs de transcription c-Jun et JunD (Claret et al., 1996). Cependant, il semble que l'effet de COPS5 sur cette activité de co-activateur soit indirect, puisque COPS5 augmente la stabilité de ces deux protéines. COPS5 joue aussi un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, en interagissant notamment avec la protéine p53 ainsi qu'avec l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{KIP1} et en entraînant leur dégradation (Tomoda et al., 1999; Zhang et al., 2008). De plus, la sur-expression de la protéine COPS5 est associée à différents cancers humains (Richardson and Zundel, 2005). COPS5 est aussi connu pour être l'un des composants du signalosome COP9 (CSN), un complexe multiprotéique dont la principale fonction est le maintien de l'activité des complexes SCF (voie ubiquitine/protéasome) (Wei et al., 2008). Adler et ses collaborateurs ont en particulier montré que COPS5 augmente l'ubiquitination de l'oncoprotéine c-Myc par le complexe SCF^{SKP2} (Adler et al., 2006). Le complexe SCF^{SKP2} est connu pour induire l'ubiquitination de c-Myc jouant un rôle sur l'activation de son activité transcriptionnelle ainsi que sur sa stabilité (Kim et al., 2003; von der Lehr et al., 2003). L'augmentation de l'ubiquitination de c-Myc par COPS5 stimule l'activité transcriptionnelle de c-Myc au niveau de gènes cibles, favorisant la prolifération et l'invasion cellulaire ainsi que l'angiogenèse (Adler et al., 2006). Enfin, une fonction de la protéine COPS5 dans la régulation de l'apoptose a été récemment découverte. En effet, COPS5 est capable d'interagir avec le facteur de transcription E2F1 et d'activer les gènes cibles d'E2F1 impliqués dans l'induction de l'apoptose (Hallstrom, 2006). Même si le mécanisme exact n'est pas encore connu, la

protéine COPS5 semble être un facteur permettant à E2F1 de stimuler spécifiquement l'apoptose et non la prolifération cellulaire. De manière intéressante, la protéine EBNA-3C est capable d'inhiber l'apoptose induite par E2F1 (Saha et al., 2012). Les différentes fonctions associées à COPS5 sont donc tout à fait en adéquation avec celles des protéines EBNA3. De plus, la protéine COPS5 a été validée par Co-IP comme partenaire des trois protéines EBNA3 (**Fig 19D**). Il serait maintenant intéressant d'étudier plus en détail la fonction de la protéine COPS5 avec les EBNA3.

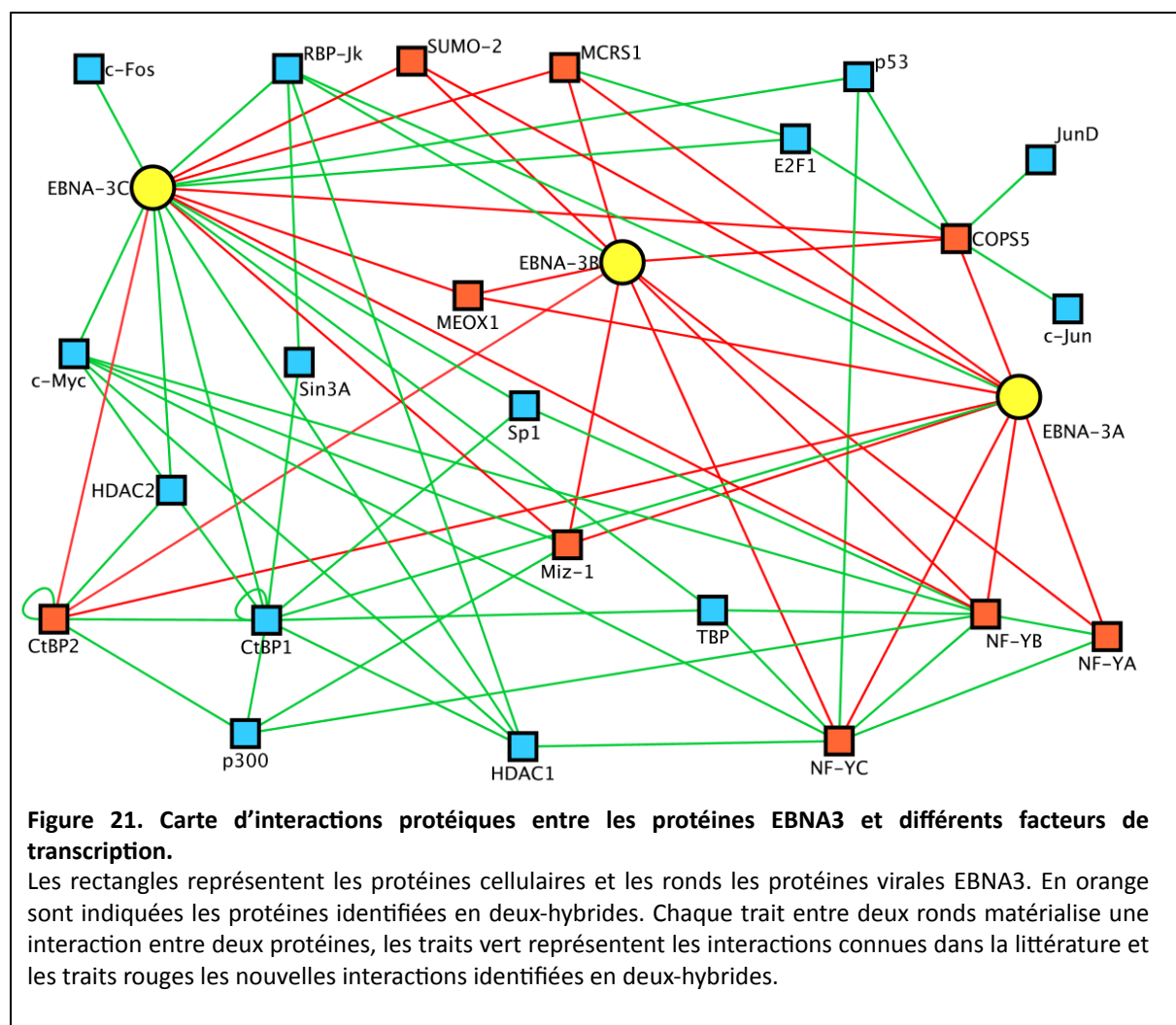
La protéine MCRS1 (Microspherule protein 1) a été identifiée lors de nos cribles deux-hybrides comme interagissant avec EBNA-3C et a été validée pour les trois protéines EBNA3 (**Fig 19E**). MCRS1 est connue pour son activité dans la régulation de la transcription en interagissant notamment avec des facteurs de transcription comme DAXX, STA13 et E2F1 (Lin and Shih, 2002; Ivanova et al., 2005; Shimono et al., 2005; Hallstrom, 2006). De plus, MCRS1 fait partie du complexe de remaniement de la chromatine hINO80 humain, impliqué dans la régulation transcriptionnelle, la réplication de l'ADN ainsi que la réparation de l'ADN (Jin et al., 2005; Cai et al., 2007). La protéine MCRS1 est aussi connue pour avoir à la fois des fonctions oncogénique et suppresseur de tumeur. En effet, MCRS1 est capable de transformer des fibroblastes embryonnaires de souris (Okumura et al., 2005) et il a été montré que la diminution de l'expression de MCRS1 dans des cellules issues de cancers colorectaux inhibe leur croissance (Shi et al., 2009). Cependant, il a aussi récemment été montré que MCRS1 est capable d'activer la voie de réponse aux dommages à l'ADN ainsi que la voie p53/ p21^{CIP1} induisant la sénescence cellulaire (Hsu et al., 2012).

Parmi les nouvelles protéines partenaires identifiées se trouve le facteur de transcription NF-Y (via sa sous-unité NF-YC). Identifié comme partenaire d'EBNA-3A, NF-Y est un facteur de transcription composé de trois sous-unités (NF-YA, NF-YB et NF-YC), liant les séquences CCAAT et contrôlant l'expression de CDK1, de la cycline A2, de la cycline B1/B2 et de nombreux autres gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Dolfini et al., 2012). Les trois sous-unités du facteur NF-Y sont requises pour l'interaction avec l'ADN. Les sous-unités NF-YB/NF-YC forment tout d'abord un complexe, permettant l'association avec la sous-unité NF-YA. Le trimère protéique ainsi formé peut alors interagir avec l'ADN. En co-immunoprécipitation en cellules HeLa nous avons montré que la sous-unité NF-YC est bien retrouvée co-immunoprécipitée avec EBNA-3A, mais aussi avec EBNA-3B. Nous avons aussi voulu tester l'interaction des deux autres sous-unités du facteur

NF-Y avec les protéines EBNA-3 (**Fig 19G-H-I**). La sous unité NF-YA interagit avec EBNA-3B, interagit faiblement avec EBNA-3A et n'interagit pas avec EBNA-3C. Enfin, la sous unité NF-YB interagit avec les trois protéines EBNA3. Il a été récemment montré que le facteur NF-Y est essentiel à l'expression du gène *bim* de rat (Hughes et al., 2010). En effet, NF-Y est capable de se fixer sur le « cœur » du promoteur du gène *bim* de rat (qui contient la séquence CCAAT) et d'activer sa transcription. Il est connu que les protéines EBNA-3A et -3C coopèrent pour induire la répression du gène *bim* humain (voir introduction §II. 2. 2. 2.). De plus, il a d'ores et déjà été montré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) qu'EBNA-3C est recrutée sur le promoteur *bim* humain aux alentours du +1 de la transcription (Paschos et al., 2012). Or, le site de fixation du facteur NF-Y (CCAAT) est conservé chez l'Homme et se situe à 58 pb du +1 de la transcription. Comme le promoteur du gène *bim* de rat est très conservé chez l'homme, nous sommes actuellement en train de vérifier si NF-Y est capable de se fixer sur le promoteur humain. Si c'est effectivement le cas, il sera donc très intéressant de vérifier si NF-Y est le facteur de transcription permettant aux EBNA3 de se fixer et de réprimer le promoteur du gène *bim* humain (voir modèle **Fig 20**).



Enfin, parmi les nouveaux partenaires identifiés se trouve le facteur de transcription ZBTB17 plus couramment appelé Miz-1 (Myc-interacting zinc finger protein 1). Miz-1 est une protéine de 803 acides aminés comportant dans sa partie C-Terminale 13 motifs en doigts de zinc (dont 12 regroupés forment le domaine de liaison à l'ADN de Miz-1). Ce facteur est particulièrement intéressant puisqu'il joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en transactivant des gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire dont les gènes *CDKN1A* (codant pour p21^{CIP1}), *CDKN1C* (codant pour p57^{KIP2}) et *CDKN2B* (codant pour p15^{INK4B}) (Staller et al., 2001; Wu et al., 2003). Nous avons identifié Miz-1 avec les protéines EBNA-3B et -3C puis validé ce partenaire cellulaire pour les trois protéines EBNA3 (**Fig 19F**). Cette protéine Miz-1 semblant vraiment intéressante par rapport aux fonctions des protéines EBNA3 je me suis intéressé plus en détail à cette interaction. La relation entre Miz-1, les EBNA3 et le cycle cellulaire sera étudiée plus en détail dans la suite de ma thèse. Toutes les interactions entre les EBNA3 et leurs partenaires cellulaires jouant un rôle dans la transcription sont représentées dans la **figure 21**.



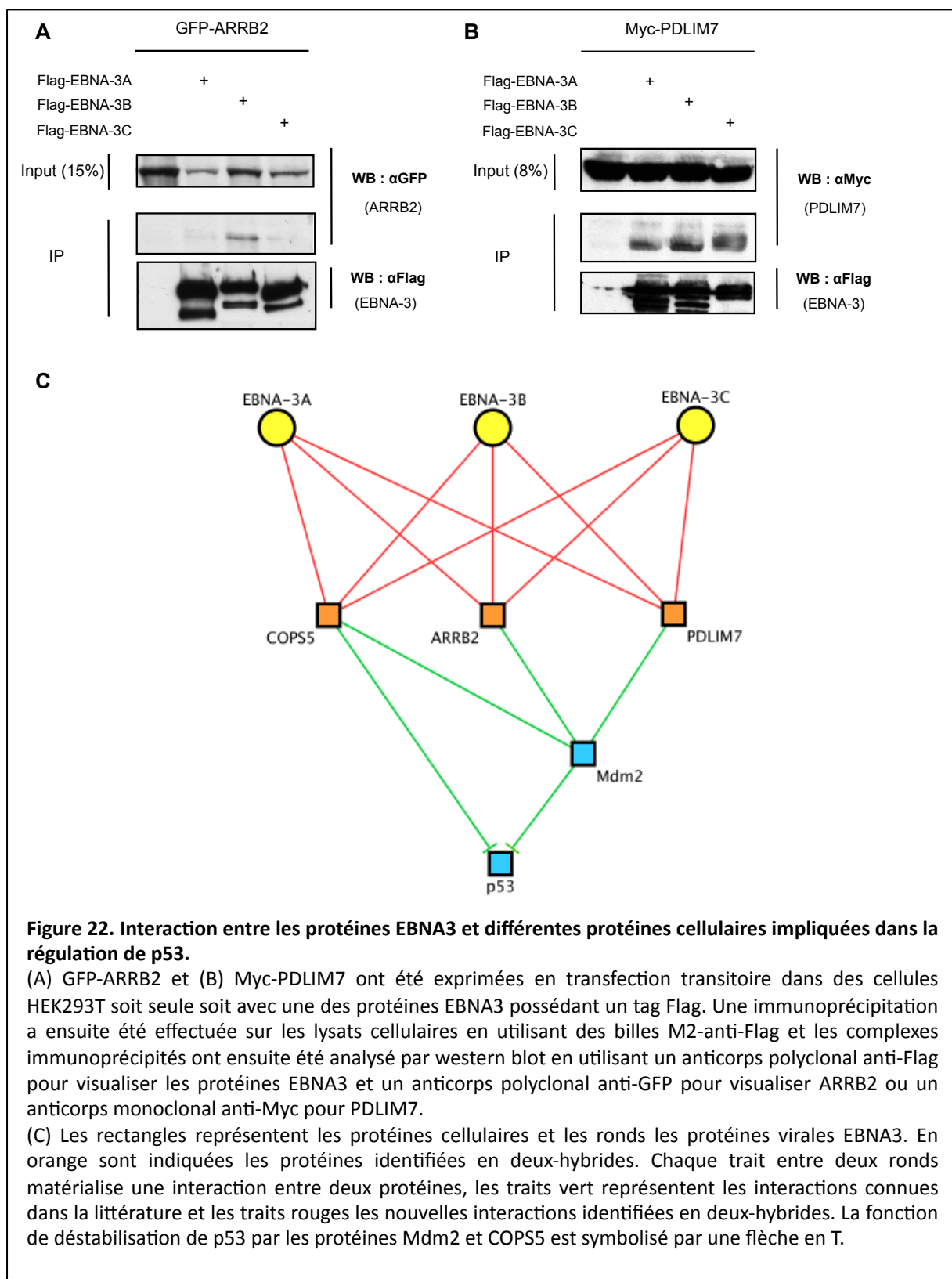
1. 2. 3. Interaction des EBNA3 avec des protéines cellulaires impliquées dans la régulation de la stabilité de p53

Dans la littérature, il est déjà connu que la protéine EBNA-3C est capable d'interagir directement avec Mdm2 et d'augmenter sa stabilité, permettant ainsi une meilleure dégradation de la protéine p53 (Saha et al., 2009). Nous avons identifié lors de nos cribles deux-hybrides des protéines cellulaires impliquées dans la régulation de la protéine suppresseur de tumeur p53 ou de la protéine Mdm2, protéine régulatrice de p53.

La protéine COPS5 notamment (citée ci-dessus), est non seulement connue pour avoir un rôle dans la transcription mais aussi pour avoir un rôle dans la régulation de p53 et Mdm2. COPS5 interagit directement avec p53 et induit sa dégradation (Zhang et al., 2008). De plus, l'expression de COPS5 stabilise la protéine Mdm2 facilitant ainsi l'ubiquitination de p53 par Mdm2 et donc la dégradation de p53 (Zhang et al., 2008).

En plus de cette protéine nous avons identifié comme partenaire potentiel d'EBNA-3A la protéine ARRB2 (Arrestin, beta 2). Cette protéine joue un rôle dans la désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G (Lefkowitz and Whalen, 2004). La protéine ARRB2 est aussi capable d'interagir avec la protéine Mdm2 et d'inhiber son activité ubiquitine ligase permettant ainsi de réduire la dégradation de p53 par Mdm2 (Wang et al., 2003a). De plus, l'expression d'ARRB2 permet la relocalisation de Mdm2 du noyau vers le cytoplasme (Wang et al., 2003b). La protéine ARRB2 est retrouvée co-immunoprécipitée avec les trois protéines EBNA3 (**Fig 22A**). L'interaction avec EBNA-3A et -3C semble faible mais cela est dû à la faible quantité de protéine ARRB2 (voir input).

Enfin, nous avons identifié la protéine PDLIM7 (PDZ and LIM domain 7) comme partenaire de la protéine EBNA-3C et nous avons ensuite validé PDLIM7 comme interagant des trois EBNA3 (**Fig 22B**). Cette protéine cellulaire, dont le rôle exact n'est pas encore élucidé, est une protéine cytoplasmique retrouvée au niveau des filaments d'actine (Durick et al., 1998; Guy et al., 1999). Cependant, il a récemment été montré que PDLIM7 joue un rôle dans la régulation de la protéine p53 (Jung et al., 2010). En effet, la protéine PDLIM7 est capable d'interagir avec Mdm2 et d'inhiber sa propre ubiquitination, stabilisant ainsi Mdm2. Cette stabilisation de Mdm2 permet une augmentation de l'ubiquitination de la protéine p53 et donc sa dégradation.

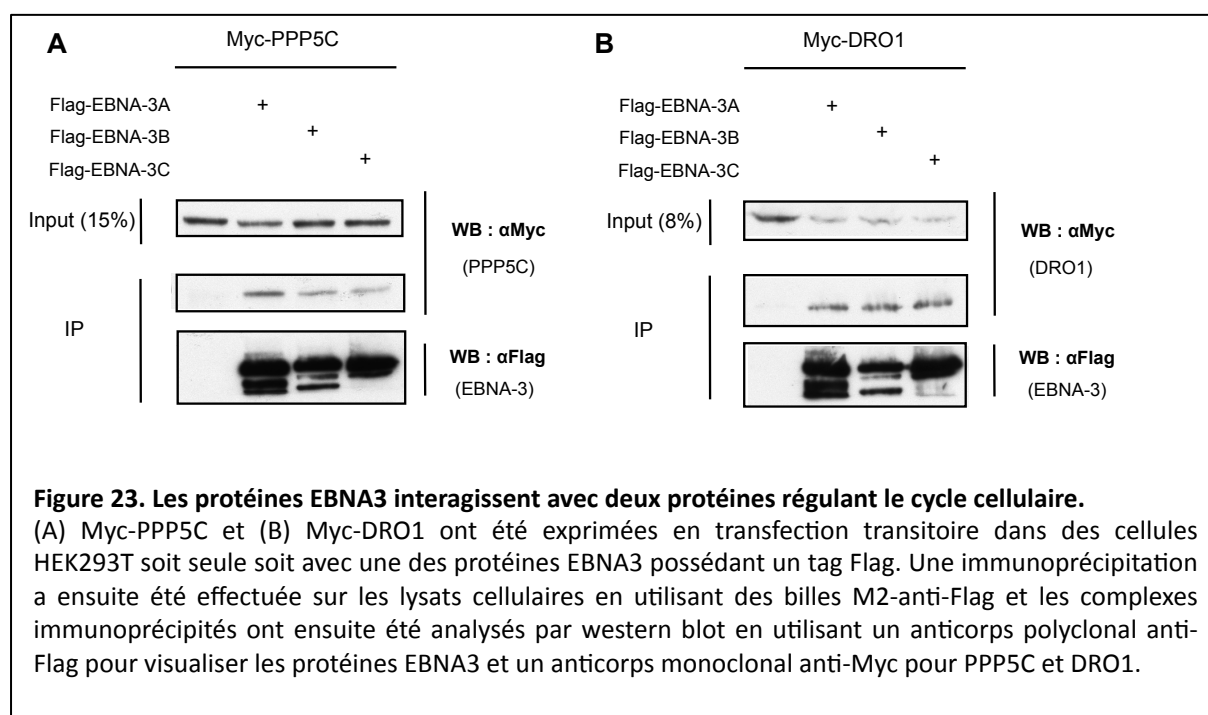


Les interactions entre les EBNA3 et ces trois protéines, pourraient permettre la déstabilisation de la protéine p53 et agir ainsi indirectement sur l'activité de p53. Les

différentes interactions entre les EBNA3 et la voie Mdm2/p53 sont représentées dans la **figure 22C**.

1. 2. 2. 4. Les autres protéines cellulaires impliquées dans la régulation du cycle cellulaire

Lors de notre crible deux-hybrides nous avons identifié la protéine PPP5C (Protéine phosphatase 5, catalytic subunit), protéine multifonctionnelle jouant un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire. Cet interactant a été validé pour les trois protéines EBNA3 (**Fig 23A**).



PPP5C est une Sérine/Thréonine phosphatase faisant partie de la grande famille des phosphoprotéines phosphatases (PPP) (Golden et al., 2008). PPP5C est tout d'abord connue pour jouer un rôle positif dans la prolifération cellulaire en inhibant la voie de signalisation des récepteurs aux glucocorticoïdes (Chen et al., 1996; Zuo et al., 1998, 1999; Golden et al., 2008). De plus, PPP5C est une protéine particulièrement intéressante puisque cette dernière fonctionne comme un régulateur positif dans la voie de signalisation induite par ATM et ATR, deux protéines kinases activant différents points de contrôle du cycle cellulaire (Abraham, 2001). En effet, il a été montré que PPP5C interagit et permet l'activation des kinases ATM et ATR en réponse aux dommages à l'ADN (Ali et al., 2004; Zhang et al., 2005; Golden et al., 2008; Kang et al., 2011). Il est connu que les trois protéines EBNA3 sont

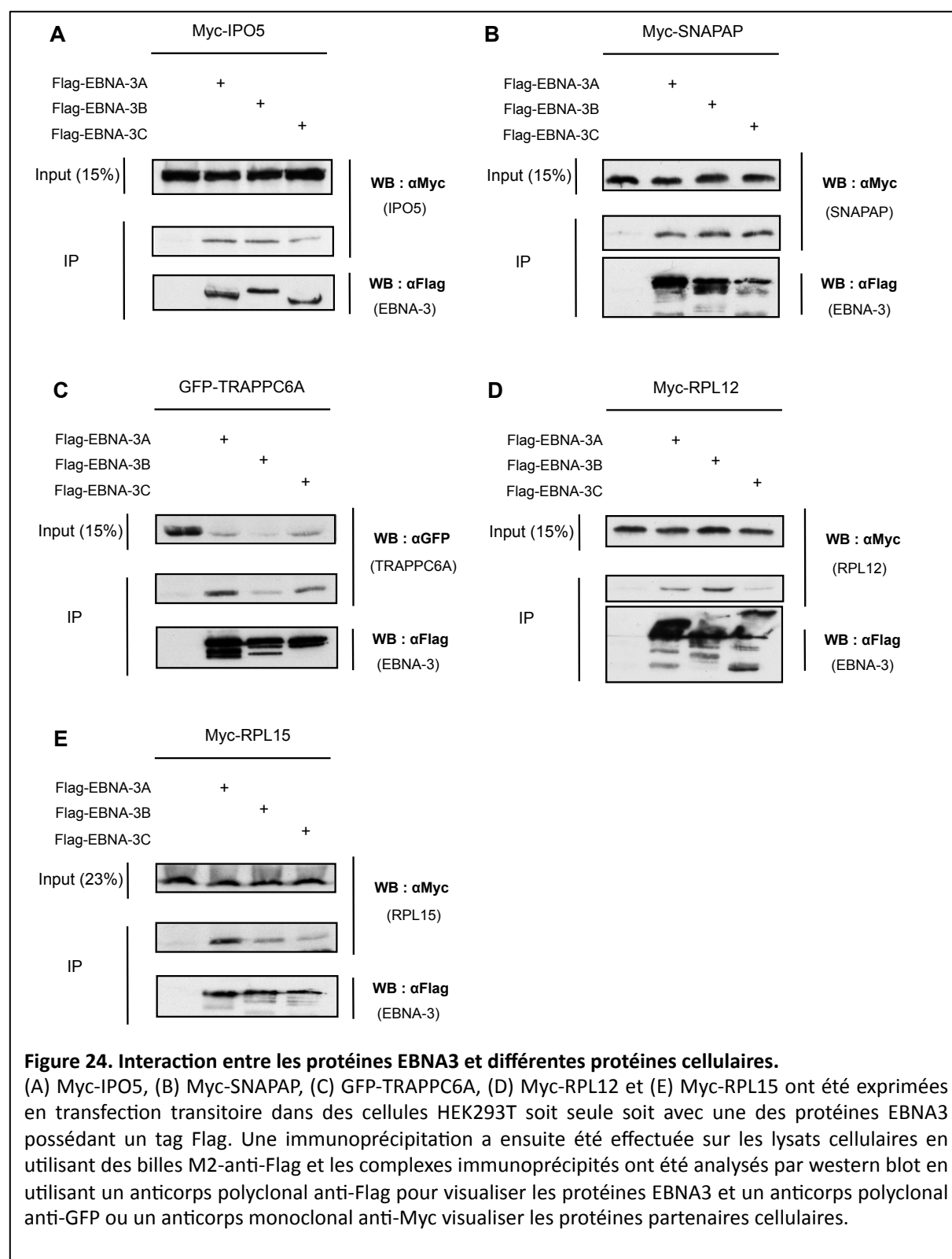
capables, individuellement, d'inhiber l'activation d'un point de contrôle G₂/M passant par la voie ATM/ATR (Krauer et al., 2003). Cette action pourrait donc passer par l'interaction avec la protéine PPP5C et l'inhibition de sa capacité à activer les deux protéines kinases. Cependant, il a été montré que l'activation de la kinase ATM par irradiation n'est pas inhibée par l'expression de la protéine EBNA-3C (Gruhne et al., 2009). Malgré ce résultat il serait quand même intéressant de vérifier si la phosphatase PPP5C joue un rôle dans l'inhibition du point de contrôle G₂/M par les protéines EBNA3. Enfin, il a été montré que PPP5C est capable d'interagir avec CDC16 et CDC27, deux-sous unités de l' APC/C (Ollendorff and Donoghue, 1997). Même si la fonction exacte de cette interaction n'est pas encore connue, il est cependant supposé que le rôle de PPP5C serait de maintenir l'APC/C sous sa forme inactive, déphosphorylée, jusqu'à l'anaphase (Ollendorff and Donoghue, 1997). Or, il a été montré que la protéine EBNA-3C est capable d'inactiver le point de contrôle du fuseau mitotique (Parker et al., 2000), durant lequel le complexe APC/C est inactivé. Il serait donc intéressant de regarder si PPP5C peut jouer un rôle dans l'inhibition de ce point de contrôle mitotique par EBNA-3C.

Nous avons aussi identifié la protéine DRO1 (Down-regulated by oncogenes protein 1), protéine suppresseur de tumeur. Cette protéine doit son nom au fait que le gène codant pour DRO1 est réprimé dans des lignées cellulaires transformées par différents oncogènes (Bommer et al., 2005). De plus, la ré-expression de DRO1 dans des cellules de cancers du colon ou du pancréas inhibe leur croissance. Cependant, le mécanisme d'action de la protéine DRO1 reste encore à être élucidé. Cette protéine DRO1 a été identifiée avec EBNA-3C et l'interaction a été validée en Co-IP avec les trois protéines EBNA3 (**Fig 23B**). Il est important de noter que le plasmide d'expression utilisé lors des Co-IP code pour une protéine DRO1 tronquée de sa partie N-Terminale.

1. 2. 2. 5. Les autres protéines cellulaires

Nous avons identifié la protéine IPO5 (Importin5) comme partenaire de la protéine EBNA-3A. Ce partenaire a été validé pour les trois protéines de la famille EBNA3 (**Fig 24A**). IPO5 est une protéine impliquée dans le transport de protéines, comportant une séquence d'adressage au noyau (NLS pour Nuclear Localization Signal) (Deane et al., 1997). Les trois protéines EBNA3 sont des protéines nucléaires et comportent toutes plusieurs NLS. IPO5

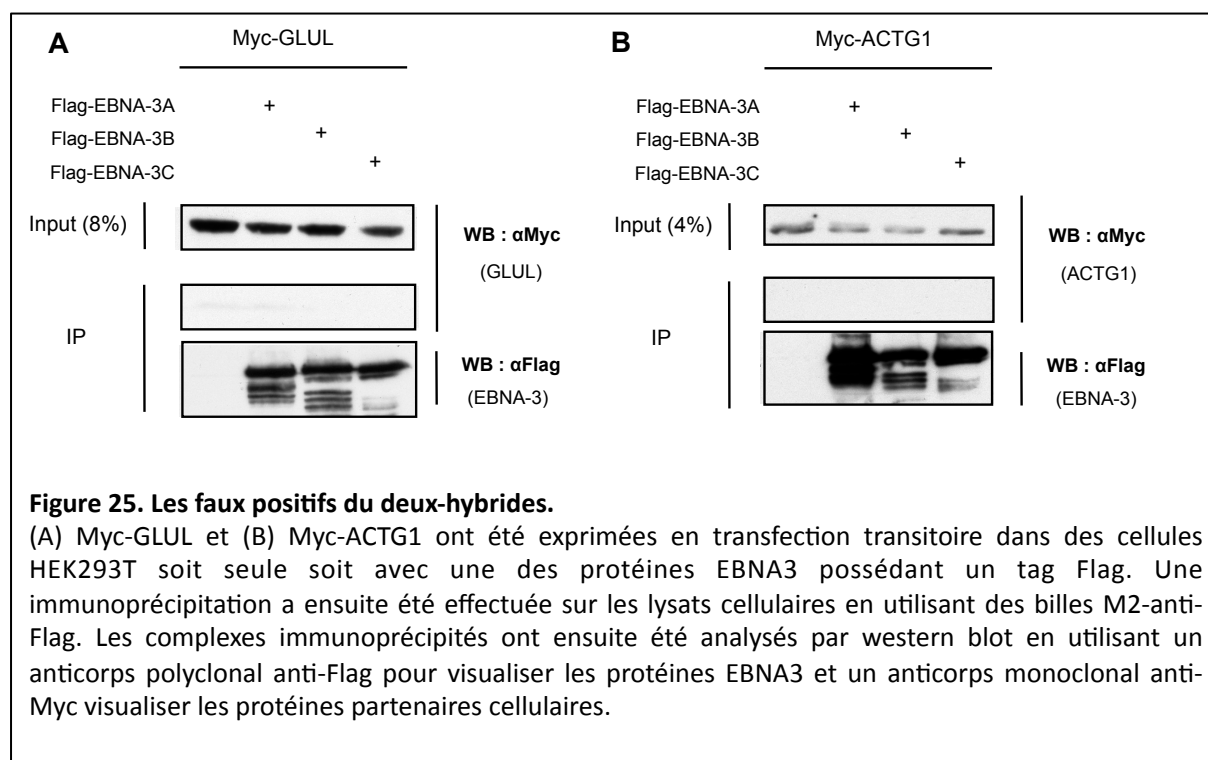
pourrait donc être l'une des protéines permettant aux protéines EBNA3 d'être localisées dans le noyau.



Certaines des protéines identifiées et validées comme partenaires pour les trois protéines EBNA3 ne semblent pas avoir de rôle direct évident avec les fonctions de ces dernières (**Fig 24B, C, D et E**). C'est le cas notamment des protéines SNAPAP, TRAPP6CA, RPL12 et RPL15. SNAPAP (SNAP-associated protein) et TRAPP6CA (Trafficking protein particle complex 6A) sont deux protéines cellulaires associées au trafic membranaire (Buxton et al., 2003; Yip et al., 2010). Quant à la protéine RPL12 (Ribosomal protein L12) et RPL15 (Ribosomal protein L15), elles font partie de la sous unité 60S du ribosome.

1. 2. 2. 6. Les faux positifs

Sur l'ensemble des partenaires que nous avons testés en co-immunoprécipitation en cellules humaines, seuls deux semblent être des faux positifs de la technique du deux-hybrides. En effet, les protéines GLUL (Glutamate-ammonia ligase) et ACTG1 (Actin, gamma 1) n'interagissent avec aucune des protéines EBNA3 (**Fig 25A et 25B**).



1. 2. 2. 7. Les partenaires non testés en Co-IP

Lors de cette étape de validation par co-immunoprécipitation nous n'avons malheureusement pas pu tester toutes les protéines cellulaires identifiées. En effet, nous ne sommes pas arrivés à disposer de plasmides d'expression pour 10 de ces protéines. Parmi elle

se trouvent quatre protéines potentiellement intéressante, la protéine PSMA7, SIAH1, HNRNPK et MED25.

PSMA7 une des sous unités du protéasome 20S, complexe protéique impliqué dans la dégradation des protéines (Coux et al., 1996). De plus, il a déjà été montré que les 3 protéines EBNA3 sont capables d'interagir avec la protéine PSMA3 qui est une autre sous-unité du protéasome 20S (Touitou et al., 2005). HNRNPK (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) est une protéine multifonctionnelle impliquée dans le remodelage de la chromatine, dans la transcription, dans l'épissage des ARN messagers ainsi que dans leur stabilité et dans la traduction (Bomsztyk et al., 2004). De manière intéressante, HNRNPK est un co-facteur transcriptionnel de la protéine p53 après dommages à l'ADN (Moumen et al., 2005; Hsueh et al., 2011). La protéine HNRNPK pourrait être un nouveau partenaire des EBNA3 en lien avec l'activité de p53. SIAH1 est une protéine ubiquitine E3 ligase régulant l'ubiquitination et la dégradation de protéines (Reed and Ely, 2002) dont l'expression est activée par la protéine p53 et contribue à l'arrêt du cycle cellulaire (Matsuzawa and Reed, 2001). Enfin, MED25 fait partie du complexe Médiateur (Ohlsson, 2010), un complexe multiprotéique composé de 25 sous-unités et jouant un rôle important dans l'activation de l'ARN polymérase II ainsi que dans le démarrage de la transcription. Il serait donc intéressant de valider cette interaction qui pourrait conduire à la mise en évidence d'une nouvelle voie par laquelle les EBNA3 régulent la transcription de gènes spécifiques.

I. 3 Conclusions et perspectives

Les différents cribles effectués nous ont permis d'identifier 36 partenaires potentiels pour les protéines virales EBNA3. Parmi ces 36 protéines cellulaires, six étaient déjà connues dans la littérature, ramenant le nombre des nouveaux interactants potentiels à 30. De plus, nous n'avons pas eu la possibilité de re-tester tous les partenaires identifiés grâce aux différents cribles effectués. Au final, nous avons pu tester en Co-IP 20 partenaires cellulaires potentiels pour les EBNA3. Sur ces 20 protéines cellulaires nous en avons validé 18 et seules 2 se sont révélées être des faux positifs de la technique du deux-hybrides. Les résultats des différentes validations effectuées par co-immunoprécipitation en cellules humaines sont résumés dans le **tableau 3**.

Sur l'ensemble des protéines identifiées comme interagissant avec les protéines EBNA3 un grand nombre provient des cribles effectués avec la banque de rate humaine. Il

serait donc important de s'assurer que ces protéines ou les transcrits codant pour ces protéines sont bien exprimés dans les lymphocytes B, cellules cibles du virus d'Epstein-Barr. De plus, il serait intéressant de continuer les validations pour les protéines qui n'ont pour le moment pas pu être testées. Enfin, le niveau d'expression de certains partenaires cellulaires chute drastiquement en présence des protéines EBNA3 (ARRB2 par exemple, **Fig 22A**). Il serait donc intéressant de vérifier si cet effet est spécifique des protéines EBNA3 et si ces dernières induisent la déstabilisation de ces protéines cellulaires.

Proie	Nom complet	Appât	Co-IP
<i>RBP-Jk</i>	<i>Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region</i>	3A / 3B / 3C	/
<i>CtBP1</i>	<i>C-Terminal binding protein 1</i>	3A / 3C	/
<i>DNAJB1</i>	<i>Heat shock protein 40</i>	3A	3A / 3B/ 3C
<i>CENPJ</i>	<i>Centromere protein J</i>	3B / 3C	3A / 3C
<i>ZYXIN</i>	<i>Zyxin</i>	3B	3A / 3B
<i>EIF3F</i>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F</i>	3C	3A / 3B/ 3C
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	3A / 3C	NT
MED25	Mediator complex subunit 25	3A	NT
STAG3L1	Stromal antigen 3-like 1	3A	NT
COL1A2	Collagen, type I, alpha 2	3C	NT
SCL25A3	Solute carrier family 25, member 3	3C	NT
MYO1F	Myosin IF	3C	NT
PSMA7	Proteasome subunit, alpha type, 7	3C	NT
SIAH1	Siah E3 ubiquitin protein ligase 1	3B	NT
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	3C	NT
PPIG	Peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)	3C	NT
COPS5	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 5	3A / 3C	3A / 3B/ 3C
SNAPAP	SNAP-associated protein	3A / 3C	3A / 3B/ 3C
Miz-1	Myc-interacting Zn finger protein-1	3B / 3C	3A / 3B/ 3C
CtBP2	C-Terminal binding protein 2	3A	3A / 3B/ 3C
PPP5C	Protein phosphatase 5, catalytic subunit	3A	3A / 3B/ 3C
NF-YC	Nuclear transcription factor Y, gamma	3A	3A / 3B
ARRB2	Arrestin, beta 2	3A	3A / 3B/ 3C
MEOX1	Mesenchyme homeobox 1	3A	3A / 3B/ 3C
TRAPPC6A	Trafficking protein particle complex 6A	3A	3A / 3B/ 3C
HOP	hsc70/Hsp90-organizing protein	3A	3A / 3B/ 3C
IPO5	Importin 5	3A	3A / 3B/ 3C
RPL15	ribosomal protein L15	3A	3A / 3B/ 3C
DRO1	Down-regulated by oncogenes protein 1	3C	3A / 3B/ 3C
RPL-12	ribosomal protein L12	3C	3A / 3B/ 3C
FBXO18	F-box protein, helicase, 18	3C	3A / 3C
SUMO-2	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2	3C	3A / 3B/ 3C
MCRS1	Microspherule protein 1	3C	3A / 3B/ 3C
PDLIM7	PDZ and LIM domain 7	3C	3A / 3B/ 3C
GLUL	Glutamate-ammonia ligase	3A	Faux Positif
ACTG1	Actin, gamma 1	3C	Faux Positif

Tableau 3. Liste des partenaires cellulaires interagissant avec les protéines EBNA3 identifiés en cribles deux-hybrides et validés par co-immunoprécipitation en cellules humaines. (NT=Non Testé)

L'ensemble de ces résultats a conduit à l'identification de nombreux nouveaux partenaires particulièrement pertinents au vu de ce que l'on connaît des fonctions des protéines EBNA3 et offre de nouvelles voies d'étude pour la fonction de ces protéines virales dans l'immortalisation des cellules B par le virus d'Epstein-Barr. Parmi ces nouveaux partenaires, le facteur de transcription Miz-1 (Myc-interacting zinc finger protein 1) a tout particulièrement attiré notre attention. Ce facteur est intéressant puisqu'il joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en transactivant des gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire dont les gènes *CDKN1A* (codant pour p21^{CIP1}), *CDKN1C* (codant pour p57^{KIP2}) et *CDKN2B* (codant pour p15^{INK4B}) (Staller et al., 2001; Wu et al., 2003). Nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'interaction entre Miz-1 et les protéines EBNA3.

II. Etude fonctionnelle de l'interaction entre la protéine Miz-1 et EBNA-3A

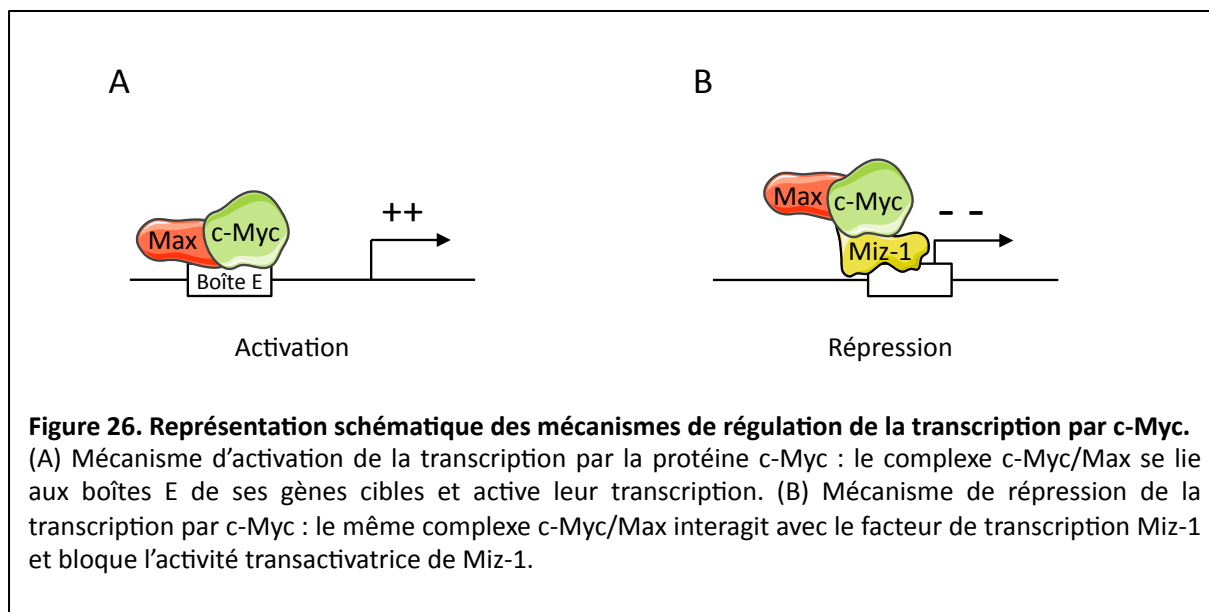
II. 1. Généralités sur le facteur de Transcription Miz-1

Les différents cribles deux-hybrides effectués au cours de ma thèse afin de rechercher de nouveaux partenaires pour les protéines de la famille EBNA3 nous ont permis d'identifier le facteur de transcription Miz-1 comme partenaire des trois protéines EBNA3. Ce facteur joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en transactivant entre autres des gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire. Le facteur de transcription Miz-1 apparaît donc comme un bon candidat pour relayer l'effet des protéines EBNA3 sur l'expression génique et sur la progression du cycle cellulaire.

II. 1. 1. Miz-1 est un partenaire de l'oncoprotéine c-Myc

L'oncoprotéine c-Myc est connue pour agir sur des fonctions biologiques variées telles que la croissance cellulaire, l'apoptose et l'arrêt de la différenciation cellulaire (Wanzel et al., 2003; Eilers and Eisenman, 2008). L'une des fonctions les plus documentée de la protéine c-Myc est sa capacité à activer la transcription en se liant directement à des séquences d'ADN spécifiques (séquences de type « CACGTG » appelée boîte E) sous la forme d'un complexe avec son partenaire, la protéine Max (**Fig 26A**). Ce complexe recrute ensuite différents co-activateurs menant à l'activation de la transcription.

Cependant, le facteur de transcription c-Myc est aussi associé à une activité répressive de la transcription. C'est en cherchant de nouveaux partenaires pour la protéine c-Myc par crible deux-hybrides en levure que Peukert et ses collègues identifièrent une nouvelle protéine qui interagissait avec c-Myc, la protéine Miz-1 (pour Myc interacting zinc finger protein 1) (Peukert et al., 1997). Depuis, les différentes études sur les mécanismes responsables de la répression transcriptionnelle induite par c-Myc ont permis de mettre en évidence que cette activité passe par la formation d'un complexe formé de l'hétérodimère c-Myc/Max et du facteur de transcription Miz-1 (**Fig 26B**) (Wanzel et al., 2003; Möröy et al., 2011).



II. 1. 2. Structure de la protéine Miz-1

Miz-1 est une protéine à doigts de zinc de 803 acides aminés composée d'un domaine POZ en N-Terminal et de 13 motifs en doigts de zinc dans sa partie C-Terminale (dont 12 sont regroupés) (**Fig 27**).

II. 1. 2. 1. Le domaine POZ

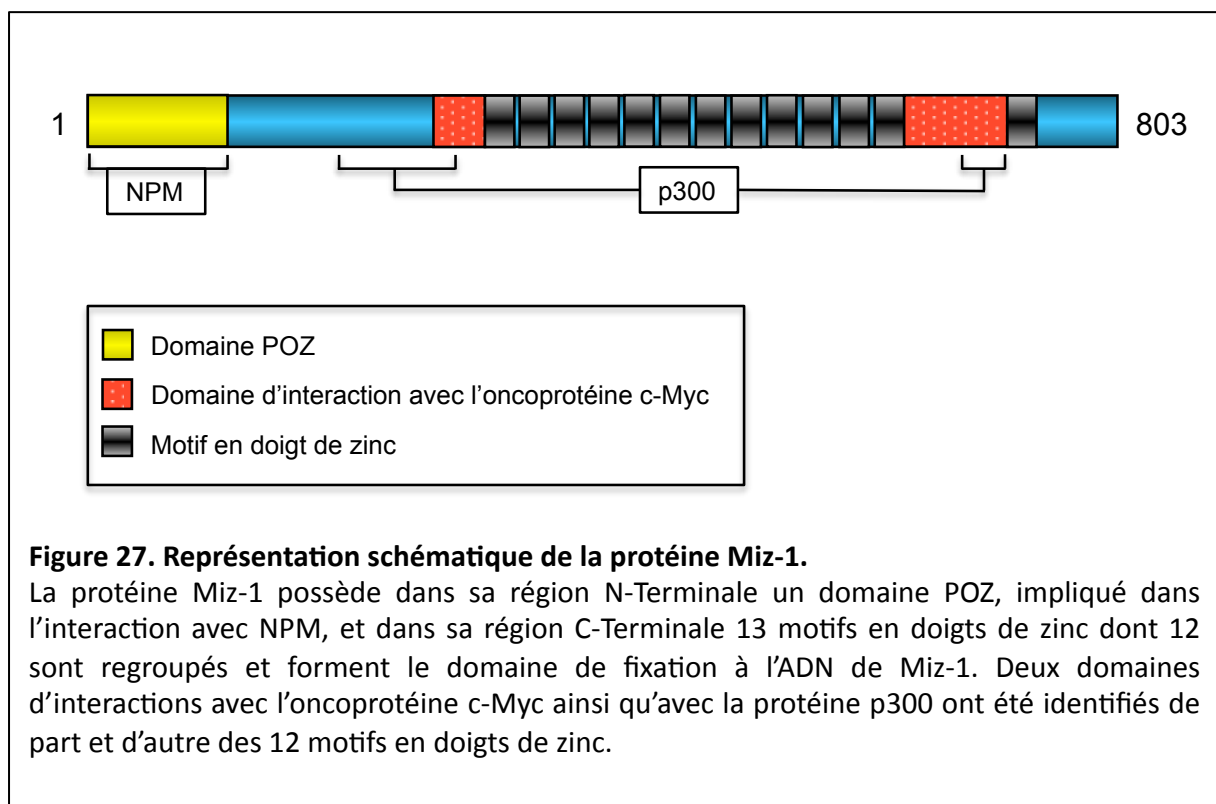
Le domaine POZ (poxvirus and zinc finger) est un domaine connu pour jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines et est retrouvé dans de nombreux facteurs de transcription à doigts de zinc (Bardwell and Treisman, 1994; Stogios et al., 2005; Perez-Torrado et al., 2006). La résolution de la structure cristallographique du domaine POZ de Miz-1 a permis de mettre en évidence que ce domaine est capable de se dimériser et de se tétramériser (Stead et al., 2007). Le domaine POZ de Miz-1 est requis pour l'activité transcriptionnelle de Miz-1 et est donc essentiel à l'arrêt de la prolifération cellulaire (Herold et al., 2002).

II. 1. 2. 2. Domaine de liaison à l'ADN de Miz-1

Le domaine de Miz-1 impliqué dans sa liaison à l'ADN a été identifié et correspond aux 12 motifs en doigts de zinc regroupés en C-Terminal de la protéine (Peukert et al., 1997; Seoane et al., 2001; Staller et al., 2001). Cependant, il a récemment été montré que le

domaine POZ est lui aussi très important puisque un mutant dépourvu de cette région n'est plus capable d'interagir avec l'ADN (Kosan et al., 2010).

La protéine Miz-1 est connue pour se fixer aux promoteurs de ses gènes cibles au niveau d'éléments initiateurs (Inr) de la transcription (5'-YYANT/ACY-3', Y=pyrimidine, et N=nucléotide) que l'on retrouve localisés aux alentours du +1 de la transcription. Une fois fixé sur ces sites, Miz-1 active la transcription en recrutant des protéines co-activatrices (Peukert et al., 1997; Staller et al., 2001; Wanzel et al., 2008). Cependant, Miz-1 peut aussi se fixer sur d'autres séquences nucléotidiques, telles que des régions riches en nucléotides guanine et cytosine (Seoane et al., 2002; Lee et al., 2011).



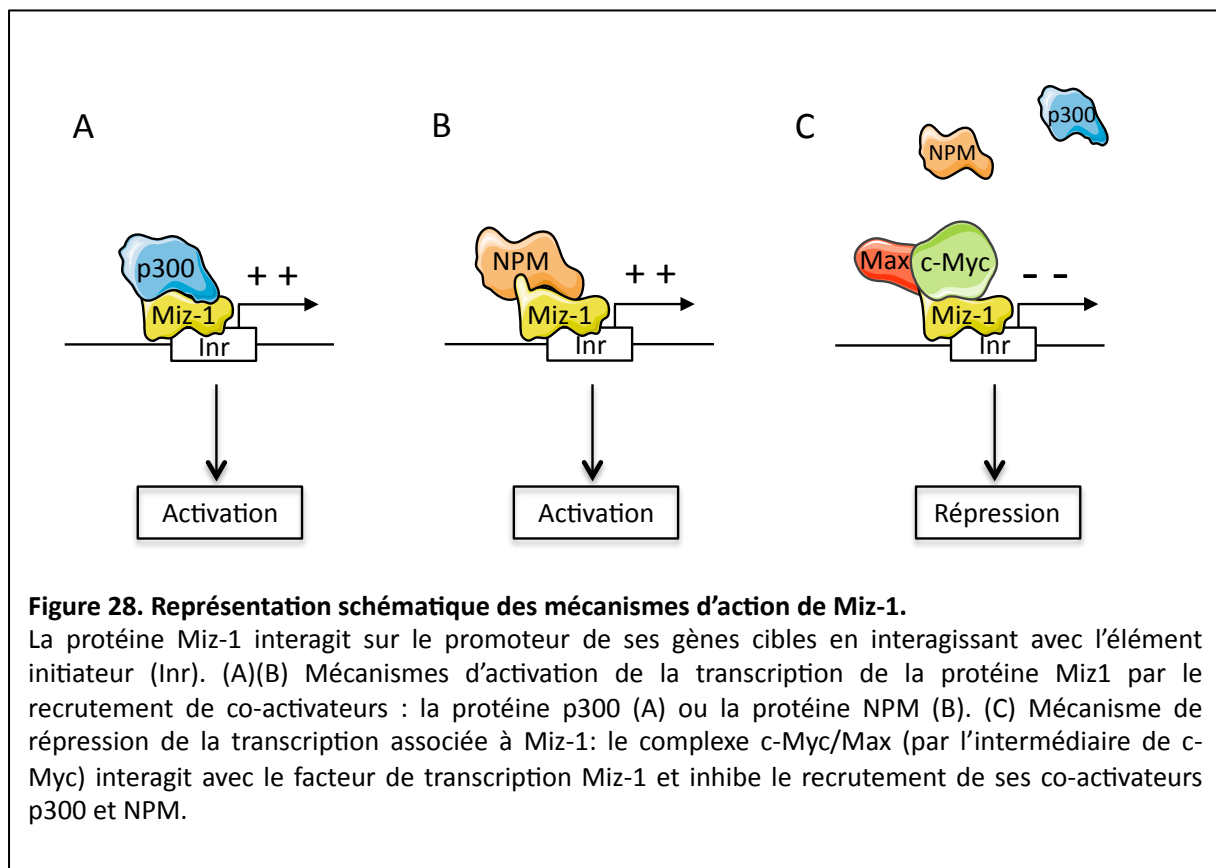
II. 1. 2. 3. Domaines d'interaction à l'oncoprotéine c-Myc

L'étude de l'interaction entre c-Myc et Miz-1 a permis de mettre en évidence deux régions de la protéine Miz-1 impliquées dans l'interaction avec c-Myc (Peukert et al., 1997). Ces deux régions d'interactions se situent de part et d'autre du domaine de liaison à l'ADN de Miz-1, entre les acides aminés 269 à 308 et 673 à 718. Une protéine Miz-1 dépourvue d'une de ces deux régions n'est plus capable d'interagir avec c-Myc, ce qui signifie que ces deux régions sont essentielles.

II. 1. 3. Miz-1 et la transcription

II. 1. 3. 1. Les mécanismes d'action du facteur de transcription Miz-1

Le facteur de transcription Miz-1 est impliqué dans l'activation ou la répression de la transcription en fonction de ses différentes interactions avec ses partenaires cellulaires. L'activation de la transcription par le facteur de transcription Miz-1 passe donc par le recrutement de co-facteurs. Pour le moment, seuls deux co-activateurs de Miz-1 ont été décrits dans la littérature : l'acétyltransférase p300 et la protéine NPM (Nucleophosmin) (Staller et al., 2001; Wanzel et al., 2008). La protéine p300 interagit avec Miz-1 au niveau de deux régions différentes situées de part et d'autre de son domaine zinc finger alors que la protéine NPM interagit avec le domaine POZ de Miz-1 (**Fig 27 et 28A, 28B**)



Cependant, la protéine Miz-1 est aussi retrouvée dans des complexes protéiques impliqués dans la répression de la transcription. En effet, par son interaction directe avec l'oncoprotéine c-Myc, la protéine Miz-1 recrute le complexe c-Myc/Max, bloquant ainsi le recrutement de ses deux activateurs et conduisant à une inhibition de la transcription (Peukert

et al., 1997; Piluso et al., 2002; Phan et al., 2005; Weber et al., 2008; Basu et al., 2009; Liu et al., 2010; Morandell et al., 2012) (**Fig 28C**). En effet, il a été montré que c-Myc fait la compétition avec p300 et NPM pour l'interaction avec Miz-1 (Staller et al., 2001; Wanzel et al., 2008). Enfin, des mécanismes épigénétiques semblent aussi être impliqués dans l'activité répressive du complexe c-Myc/Miz-1 via le recrutement de la méthyltransférase Dnmt3A par c-Myc (Brenner et al., 2005).

II. 1. 3. 2. Les gènes cibles de Miz-1

Miz-1 est connue pour son rôle très important dans l'arrêt du cycle cellulaire de par sa capacité à activer la transcription de gènes codant pour des inhibiteurs du cycle cellulaire comme p15^{INK4B} et p21^{CIP1} ou des inhibiteurs de l'apoptose comme BCL2 (Peukert et al., 1997; Staller et al., 2001; Wu et al., 2003; Patel and McMahon, 2006, 2007; Wanzel et al., 2008).

II. 1. 3. 2. 1. La régulation du gène *CDKN2B* codant p15^{INK4B}

Le gène *CDKN2B* code pour l'inhibiteur du cycle cellulaire p15^{INK4B} qui bloque le cycle en phase G₁. Il a été montré que la protéine Miz-1 est capable d'interagir avec l'élément Inr du gène *CDKN2B* et d'activer la transcription de ce dernier par le recrutement de ses deux co-activateurs p300 et NPM (Staller et al., 2001; Wanzel et al., 2008). Il a de plus été montré que Miz-1 interagit avec les facteurs de transcription Smad3 et Smad4 dont les sites de fixation à l'ADN se trouvent en aval de celui de Miz-1 (à environ 400 nucléotides du +1 de la transcription). Il a donc été suggéré que l'interaction entre Miz-1 et les protéines Smad induit une courbure de l'ADN permettant la formation d'un grand complexe protéique activateur de la transcription, complexe déstabilisé en présence de la protéine c-Myc (Seoane et al., 2001).

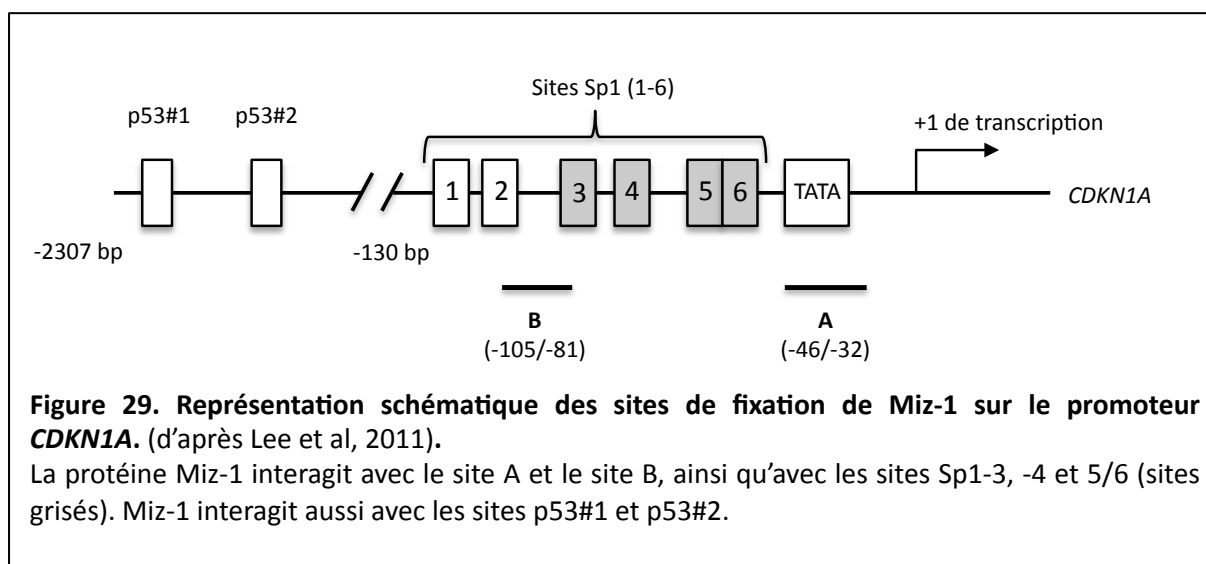
Des protéines cellulaires autres que c-Myc sont capables d'interagir avec Miz-1 et de moduler son activité transcriptionnelle. C'est le cas notamment de la protéine HCF-1 (Humain host cell factor-1), un facteur de transcription originellement identifié comme un facteur requis pour l'induction des gènes précoces d'HSV (Herpes Simplex Virus) par le transactivateur viral VP16 (Zargar and Tyagi, 2012). HCF-1 est par ailleurs une protéine nécessaire à la prolifération cellulaire (Goto et al., 1997; Zargar and Tyagi, 2012). L'interaction entre HCF-1 et Miz-1 inhibe la transactivation induite par Miz-1 au niveau du gène *CDKN2B* (Piluso et al., 2002). HCF-1 interagit avec deux régions distinctes de Miz-1 (le domaine POZ et la région C-Terminale entre les acides aminés 637 et 803) et, comme la

protéine c-Myc, HCF-1 entre en compétition avec p300 pour l'interaction avec Miz-1 (Piluso et al., 2002). La protéine Gfi-1, facteur de transcription à motif à doigts de zinc, est aussi un partenaire de Miz-1 (Basu et al., 2009) et il a été montré que le complexe Miz-1/Gfi-1 réprime la transcription au promoteur du gène *CDKN2B* (Basu et al., 2009). Bien que le mécanisme exact de répression de la transcription par Gfi-1 ne soit pas encore élucidé, il a été montré qu'il existe un tri-complexe sur l'ADN composé de Miz-1, c-Myc et Gfi-1 (Basu et al., 2009; Liu et al., 2010). Enfin, la protéine ECRG1, une protéine suppresseur de tumeur, interagit aussi avec Miz-1 (Zhao et al., 2004) et sa sur-expression dans des cellules de cancer de l'œsophage inhibe la prolifération cellulaire en induisant un arrêt des cellules en phase G₁. Cette activité de ECRG1 est due à son interaction avec Miz-1 et sa coopération avec cette dernière pour transactiver le gène *CDKN2B* (Zhao et al., 2004).

II. 1. 3. 2. 2. La régulation du gène *CDKN1A* codant p21^{CIP1}

La protéine p21^{CIP1} est un membre de la famille des inhibiteurs de kinase cycline-dépendantes CIP/KIP, qui inclut aussi les protéines p27^{KIP1} et p57^{KIP2}, et elle joue un rôle prédominant dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Dotto, 2000; Harada and Ogden, 2000; Gartel and Tyner, 2002). p21^{CIP1} participe à l'arrêt des cellules après dommages à l'ADN et sa sur-expression induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ et G₂ ou S (Ogryzko et al., 1997; Niculescu et al., 1998).

Le gène *CDKN1A* codant pour p21^{CIP1} est un gène cible de la protéine Miz-1 (Claassen and Hann, 2000; Seoane et al., 2002). Le facteur de transcription Miz-1 est en effet capable de se fixer sur différents éléments du promoteur du gène *CDKN1A* et d'activer la transcription en recrutant p300 et NPM. Initialement, deux sites d'interaction pour Miz-1 sur le promoteur *CDKN1A* ont été identifiés, un premier site A entre les nucléotides -46 et -32 comprenant la boîte TATA, et un site B plus en amont entre les nucléotides -105 et -81 (Seoane et al., 2002) (**Fig 29**). Par ailleurs, le site B contient deux sites d'interaction pour le facteur de transcription Sp1 (Sp1-2 et Sp1-3). Le promoteur *CDKN1A* possède en effet 6 sites de fixation pour Sp1, et il a été montré que Miz-1 est capable *in vitro* d'interagir directement avec les sites 3, 4 et 5/6 (Lee et al., 2011). Dans cette même étude, Lee et ses collègues ont également montré que Miz-1 est capable de lier directement les deux éléments de réponse de p53 du promoteur *CDKN1A*.



Comme pour le promoteur du gène *CDKN2B* les protéines c-Myc et Gfi-1, par leur interaction avec Miz-1, inhibent l'activité transactivatrice de cette dernière au promoteur du gène *CDKN1A* (Seoane et al., 2002; Liu et al., 2010). L'interaction de c-Myc avec Miz-1 augmente l'efficacité de l'interaction de Miz-1 à l'ADN (Seoane et al., 2002). L'oncoprotéine BCL6, protéine requise pour la formation de centres germinatifs, interagit aussi avec le facteur de transcription Miz-1 et réprime la transcription du gène *CDKN1A* (Phan et al., 2005). Cette régulation du gène *CDKN1A* par BCL6 permet d'inhiber l'arrêt du cycle cellulaire d'une manière indépendante de p53 dans les cellules B du centre germinatif, facilitant ainsi la prolifération des cellules B dans ces centres (Phan et al., 2005). Un autre partenaire identifié pour la protéine Miz-1 et impliqué dans la répression du gène *CDKN1A* est le facteur de transcription ZBTB4 (Weber et al., 2008). Il a en particulier été montré que ZBTB4 est capable d'inhiber l'arrêt du cycle cellulaire induit par la protéine p53 en interagissant avec Miz-1 sur le promoteur *CDKN1A* et en recrutant Sin3a et Sin3b (Weber et al., 2008). Il a aussi récemment été montré que l'oncoprotéine E7 du papillomavirus humain 16 (HPV-16) est recrutée sur le promoteur du gène *CDKN1A* par Miz-1 et inhibe sa transcription (Morandell et al., 2012).

Enfin, un nouveau mécanisme de répression de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription Miz-1 a récemment été décrit. Lee et ses collaborateurs ont en effet montré que l'oncoprotéine KR-POK (kidney cancer-related POZ-domain Krüppel zinc-finger protein), une protéine fortement exprimée dans la majorité des cancers du rein, est capable de faire la compétition avec Miz-1 pour l'interaction à l'ADN, déplaçant ainsi la protéine Miz-1 du promoteur du gène *CDKN1A* (Lee et al., 2011).

Le promoteur du gène *CDKN1A*, codant pour l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{Cip1}, est donc finement régulé par un grand nombre de facteurs de transcription dont la protéine Miz-1.

II. 1. 3. 2. 3. La régulation du gène *bcl2*

Les protéines de la famille BCL2 sont des protéines clés de l'apoptose qui incluent à la fois des protéines pro- et anti-apoptotiques (Cory and Adams, 2002). Le gène *bcl2* codant la protéine BCL2 fait partie des protéines anti-apoptotiques.

Le facteur de transcription Miz-1 est capable de se fixer sur l'élément Inr du gène *bcl2* et d'activer sa transcription, favorisant ainsi la survie des cellules (Patel and McMahon, 2007). Comme nous l'avons vu précédemment pour *CDKN2B* et *CDKN1A*, l'oncoprotéine c-Myc, en interagissant avec Miz-1, inhibe la transcription du gène *bcl2* et cette répression est essentielle à l'induction de l'apoptose par c-Myc (Patel and McMahon, 2006, 2007). Enfin, l'oncoprotéine BCL6 est aussi capable de réprimer le gène *bcl2* par son interaction avec Miz-1 (Saito et al., 2009). Il a été suggéré que cette fonction de BCL6 serait importante pour l'induction de la mort par apoptose des cellules B des centres germinatifs si ces dernières n'ont pas une bonne affinité avec l'antigène. Cette répression du gène *bcl2* par BCL6 est bloquée dans les lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL pour Diffuse Large B Cell Lymphoma) et les lymphomes folliculaires dans lesquels la protéine BCL6 est sur-exprimée (Saito et al., 2009). Il est donc suggéré que l'inhibition de la répression de *bcl2* par le complexe Miz-1/BCL6 est un événement critique dans la formation de ces cancers.

II. 1. 3. 2. 4. Les autres gènes cibles de Miz-1

Une grande partie des études sur Miz-1 s'est concentrée sur son rôle dans la régulation avec l'oncoprotéine c-Myc des gènes codant les inhibiteurs p15^{INK4B} et p21^{CIP1}. Cependant, le complexe Miz-1/c-Myc semble impliqué dans la régulation de très nombreux gènes. Il a notamment été montré que Miz-1/c-Myc est capable de se fixer et de réprimer le promoteur du gène *CDKN1C* codant l'inhibiteur des kinases cycline dépendante p57^{KIP2} (Adhikary et al., 2003; Wanzel et al., 2004), le promoteur du gène codant la cycline D1 (Peukert et al., 1997), le promoteur du gène codant la protéine MAD4 impliquée dans la différenciation des cellules (Kime and Wright, 2003) et les promoteurs des intégrines $\alpha 6$ et $\beta 1$ (Gebhardt et al., 2006).

II. 1. 3. 3. Régulation de la protéine Miz-1

II. 1. 3. 3. 1. La localisation cellulaire de Miz-1

La découverte initiale de Miz-1 comme partenaire de c-Myc a permis de montrer que Miz-1 est une protéine nucléo-cytoplasmique et que l'interaction avec c-Myc relocalise Miz-1 dans le noyau et la rend insoluble (Peukert et al., 1997). Il a de plus été montré que Miz-1 interagit avec les microtubules et que la dégradation de ces derniers permet la translocation de Miz-1 du cytoplasme vers le noyau conduisant aussi à l'activation des gènes cibles de Miz-1 (Ziegelbauer et al., 2001, 2004). Le domaine POZ de Miz-1 est essentiel à cette translocation puisqu'un mutant de Miz-1 dépourvu de ce domaine ne peut pas être relocalisé dans le noyau après dégradation des microtubules (Ziegelbauer et al., 2001). La protéine Miz-1 ne possédant pas de séquence de localisation nucléaire (NLS) propre, il a été suggéré que le domaine POZ pourrait participer au recrutement de facteurs d'import nucléaire. La localisation de Miz-1 semble donc être un élément important dans la régulation des gènes cibles de ce facteur de transcription.

II. 1. 3. 3. 2. Réponse aux dommages à l'ADN

Il a été montré que la protéine Miz-1 est activée et arrête le cycle cellulaire suite aux dommages à l'ADN après traitement des cellules aux UV. L'association de la protéine TopBP1 (topoisomerase II binding protein 1) avec Miz-1 est critique pour la régulation de la prolifération des cellules après traitement aux UV (Herold et al., 2002). Herold et ses collègues ont en effet montré que d'une part TopBP1 est recrutée par Miz-1 sur le promoteur du gène *CDKN1A* et inhibe l'activité transactivatrice de Miz-1 et que d'autre part, après traitement aux UV, TopBP1 se dissocie de Miz-1 permettant à cette dernière d'activer le gène *CDKN1A* menant à un arrêt du cycle cellulaire.

II. 1. 3. 3. 3. Réponse au TGF- β

Le TGF- β est une cytokine connue pour stopper la division des cellules épithéliales en inhibant l'oncoprotéine c-Myc et en activant le gène *CDKN2B* par un mécanisme impliquant les facteurs de transcription de la famille SMAD (Seoane et al., 2001). L'inhibition de c-Myc par le TGF- β permet à la protéine Miz-1 d'activer le promoteur du gène *CDKN2B*. De la même manière, le gène *CDKN1A* est lui aussi activé par le facteur de transcription Miz-1

après traitement de cellules épithéliales par le TGF- β (Claassen and Hann, 2000; Seoane et al., 2002).

II. 1. 4. La protéine Miz-1 est une protéine multifonctionnelle

La protéine Miz-1 est exprimée de manière ubiquitaire dans tous les tissus et il semble que cette dernière joue un rôle dans le développement embryonnaire. En effet, des souris déficiente pour Miz-1 ne sont pas viables et meurent au jour embryonnaire E7,5 coïncidant avec le moment de la gastrulation (Adhikary et al., 2003). De plus, l'expression d'une forme tronquée de Miz-1 (dépourvue de son domaine POZ) mène à un arrêt du développement chez la souris à E14 (Kosan et al., 2010).

Bien que Miz-1 soit un facteur de transcription, cette dernière possède des fonctions non liées à son activité transcriptionnelle. Il a notamment été montré que la protéine Miz-1 interagit avec la protéine ARF et avec la protéine suppresseur de tumeur p53, lui permettant d'interférer avec la voie p53-ARF-MDM2 (Miao et al., 2010). Le modèle proposé est que Miz-1, en interagissant avec le domaine de fixation à l'ADN de p53, inhibe l'activité transcriptionnelle de p53. Lorsque la protéine ARF est fortement exprimée, cette dernière fait la compétition avec p53 pour l'interaction avec Miz-1, permettant de libérer la protéine p53 du complexe répresseur avec Miz-1 (Miao et al., 2010). Cependant, une étude encore plus récente a montré que la protéine Miz-1 au contraire augmente l'affinité de p53 à l'ADN (Lee et al., 2011). Le rôle de l'interaction entre p53 et Miz-1 reste donc encore à être élucidé.

Miz-1 est retrouvé dans le cytoplasme des cellules, cependant, la ou les fonctions de cette localisation ne sont pas encore bien comprises. La présence de Miz-1 dans le cytoplasme pourrait simplement permettre son inactivation et son relargage rapide dans le noyau des cellules en cas de stress ou de signaux nécessitant l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, Miz-1 peut aussi avoir des fonctions spécifiques dans le cytoplasme. En effet, une étude récente a montré que Miz-1 interagit avec la protéine JNK1 (c-Jun N-Terminal Kinase) et que cette interaction inhibe la mort cellulaire induite par l'activation de JNK1 dépendant du TNF- α (Liu et al., 2009). D'autres études sont nécessaires pour bien comprendre le rôle de la protéine Miz-1 dans le cytoplasme.

II. 2. Article : Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A modulates cellular gene transcription through interaction with Miz-1

Afin de mieux comprendre l'action des protéines EBNA3 au niveau moléculaire, nous avons cherché à identifier de nouveaux partenaires cellulaires pour les trois protéines virales EBNA-3A, -3B et -3C. A l'aide d'un crible deux-hybrides en levure, nous avons identifié la protéine Miz-1, facteur de transcription originellement identifié comme un partenaire de l'oncoprotéine c-Myc, comme un partenaire potentiel des protéines EBNA3. Miz-1 joue un rôle dans l'arrêt de la transcription en transactivant ses gènes cibles incluant *CDKN1A*, *CDKN1C* et *CDKN2B*. Nous avons confirmé l'interaction entre les trois protéines EBNA3 et Miz-1 *in vitro* par des expériences de GST-pull down ainsi que par co-immunoprécipitation en cellules HeLa. Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés à la protéine EBNA-3A et nous avons montré que Miz-1 interagit avec EBNA-3A dans le système plus physiologique des lignées lymphoblastoïdes (LCL) dans lesquelles l'ensemble des protéines de latence sont exprimées et que EBNA-3A relocalise Miz-1 du cytoplasme vers le noyau des cellules. Nous avons ensuite étudié l'effet de la protéine virale EBNA-3A sur l'activation de la transcription induite par Miz-1. Pour cela, nous avons comparé le niveau des transcrits de certains gènes cibles de Miz-1 par RT-qPCR dans des LCL exprimant ou non EBNA-3A. De manière intéressante certains gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire (dont *CDKN2B*) sont différemment exprimés en présence d'EBNA-3A. Enfin, nous avons pu montrer que la protéine virale EBNA-3A est capable de réprimer l'activation de la transcription de Miz-1 en inhibant le recrutement d'une de ses protéines co-activatrices, la protéine NPM. Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les protéines EBNA3 et plus largement EBV, dérégulent le cycle cellulaire.

Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A modulates cellular gene transcription through interaction with Miz-1

Quentin Bazot^{1,2,4}, Thibaut Deschamps^{1,2,4}, Sandrine Duron^{1,2,4}, Lionel Tafforeau^{3,4}, Marie L. Hertle⁵, Chantal Rabourdin-Combe^{3,4}, Vincent Lotteau^{3,4}, Bettina Kempkes⁵, Henri Gruffat^{1,2,4} and Evelyne Manet^{1,2,4,# *}

¹INSERM U758, Unité de Virologie Humaine, Lyon, France; ²Ecole Normale Supérieure de Lyon, France; ³INSERM U851, IMAP Team, Lyon, France; ⁴Université de Lyon, Lyon, France; ⁵ Department of Gene Vectors, Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health, Munich, Germany.

* To whom correspondence should be addressed. Unité de Virologie Humaine, INSERM U758, ENS-Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon, cedex 07, France.

Tel: +(33) 472-728-176; Fax: +(33) 472-728-137; E-Mail: evelyne.manet@ens-lyon.fr

ABSTRACT

The Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 3 family of protein (EBNA-3A, -3B and -3C) participate in primary B-cell transformation. To better understand the function of these proteins, we searched for interacting partners using a yeast two-hybrid screen. One of the proteins identified in this screen is the Myc-interacting zinc finger protein-1 (Miz-1), a transcription factor initially characterized as a binding partner of c-Myc. Miz-1 has a cell growth arrest activity via inhibition of cell-cycle progression and has been shown to activate transcription of target genes including *CDKN1A*, *CDKN1C* and *CDKN2B*. We first confirmed the interaction between the three EBNA3s and Miz-1 by GST-pull down assay *in vitro* and co-immunoprecipitation from HeLa cells transiently transfected with EBNA3s and Miz-1 expression vectors. We then focused on EBNA-3A to establish the physiological relevance of these interactions by showing that EBNA-3A and Miz-1 could be co-immunoprecipitated from a lymphoblastoid cell line (LCL) expressing endogenous EBNA-3A and Miz-1 and that EBNA-3A relocalizes Miz-1 from the cytoplasm to the nucleus of the cells. We next investigated the effect of EBNA-3A on Miz-1-dependent regulation by comparing the transcript levels of selected Miz-1 target genes between EBNA-3A positive and negative LCLs by RT-qPCR. Interestingly, several Miz-1 target genes, among which *CDKN2B*, were found to be differentially regulated in the presence of EBNA-3A. We then showed that EBNA-3A inhibits Miz-1 dependant activation of a reporter gene placed under the control of the human *CDKN2B* core promoter and provide evidence that EBNA-3A inhibits transcriptional activation by Miz-1 by interfering with the recruitment of one of its co-activator, NPM.

INTRODUCTION

Epstein-Barr virus (EBV) is an ubiquitous herpesvirus associated with several human cancers both in immuno-competent individuals (Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease (HD), rare T-cell and NK-cell lymphomas, undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC), gastric carcinomas) and immuno-compromised individuals (lymphoproliferations and lymphomas in particular in post-transplant patients (PTLD: Post-Transplant Lymphoproliferation Disease) (1). Primo-infection is usually asymptomatic when it occurs in childhood but later in life can result in Infectious Mononucleosis (MNI). After primo-

infection, the virus persists in a life-long latent state (in memory B cells) in infected individuals with intermittent viral production occurring in the oropharynx.

EBV has the unique capacity to activate and to induce growth transformation of resting primary human B-lymphocytes, upon their *in vitro* infection, leading to the establishment of lymphoblastoid cell lines (LCLs). In these cells, there is no virus production, but nine viral proteins - six nuclear antigens (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C and -LP) and three membrane proteins (LMP-1, -2A and -2B) - as well as several non-coding RNAs and miRNAs are expressed, which collaborate to induce and maintain continuous proliferation of these cells (reviewed in (2,3)). Interestingly, this gene expression program, called latency III, closely mimics that found in PTLDs.

EBNA-3A, -3B and -3C genes are arranged in tandem in the EBV genome and are thought to originate from a series of gene duplication events. Their structure is very similar with a short 5'-coding exon and a long 3'-coding exon, and the resulting proteins share limited but significant amino acid sequence homology, especially in their N-Terminal. Initial genetic studies using EBV recombinants suggested that EBNA-3C and EBNA-3A (but not -3B) were absolutely required for immortalization of B lymphocytes *in vitro* (4). However, recently, Hertle et al were able to establish LCLs infected with a recombinant EBV deficient for EBNA-3A although these EBNA-3A negative cell lines exhibit reduced proliferation rates and elevated levels of apoptosis (5). On the other hand, LCLs that express either a conditional EBNA-3A, or EBNA-3C, mutant cease to proliferate in the absence of functional EBNA-3A or EBNA-3C respectively (6) (7). Interestingly, expression of EBNA-3C is not able to reverse the EBNA-3A deficient phenotype and, reciprocally.

The EBNA3s are functionally pleiotropic proteins which have properties of transcription factors but which also appear to be involved in the control of cell proliferation by directly interacting with proteins such as p53 (8) and cyclin A (9) or else in proteasome-dependent protein degradation by interacting with protein complexes such as SCF^{SKP2} (10,11). Given the fact that the EBNA3 proteins do not interact directly with DNA, their properties as transcriptional regulators have been first characterized by using heterologous GAL4-dependent reporter gene assays. As full length proteins, EBNA-3A and EBNA-3C appear to act as transcriptional repressors, whereas various protein domains of either EBNA-3A or EBNA-3C have been reported to exhibit activating functions as well as repressive activity (12) (13) (14-16). Transcriptional activation by the EBNA3 proteins might be linked to their interaction with prothymosin α (Prot α) and the Histone acetyltransferase (HAT), p300 (17,18). Repression by the EBNA3s has been shown to be mediated by various co-repressor

proteins or protein complexes among which the C-Terminal-binding protein 1 (CtBP1) (19,20) and the histones déacétylases, HDAC1 and 2 (21,22). Furthermore, it has recently been shown that, together, EBNA-3A and EBNA-3C trigger the recruitment of polycomb repressive complex 2 (PRC2) core subunits to the *Bim* promoter leading to local trimethylation of histone H3 lysine 27 (H3K27me3) (23).

Most importantly, all EBNA3s interact with a sequence specific cellular DNA-binding factor RBP-Jk or RBPJ (also called CBF1). RBPJ is the same protein that binds and targets to DNA the EBV transcriptional activator EBNA-2 and the Notch-IC effector of the Notch signalling pathway. By itself RBPJ is a transcriptional repressor by recruiting co-repressor complexes to its target promoters. By interacting with RBPJ bound to specific DNA sequences in the EBV C- and LMP1/LMP2 promoters, EBNA2 appears to displace the RBPJ co-repressor complex and activates transcription of most of the genes expressed during the latency III expression program (including the EBNA3s). The EBNA3s have been shown to interfere with this RBP-J-dependent activation of the viral Cp and LMP1/LMP2A promoters by EBNA2, in transient reporter gene assays and are thus believed to be part of an auto-regulatory feedback loop controlling their own expression as well as that of EBNA-2 (12,14,16,24,25).

Via their capacity to regulate transcription or via other mechanisms, the EBNA3s appear to have important cell-cycle associated activities as well as antiapoptotic functions. EBNA3C can cooperate with *Ha-ras* in the immortalization and transformation of REFs and relieve suppression of REF transformation by the cyclin D-dependent kinase inhibitor (CDKI) p16^{INK4A} (26). Overexpressed EBNA3C can suppress metaphase arrest induced by activators of the mitotic spindle checkpoint such as nocodazole (27). In BL cells, EBV provides important protection from apoptosis induced by different cytotoxic agents that might be due to the action of the EBNA3 proteins (28-30). Recently, it has been shown that EBNA-3A and EBNA-3C cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim in BL cell lines (31).

In order to better understand the mechanisms involved in the multiple functions of the EBNA3 we used a large-scale yeast two-hybrid screen to identify the principal interactions of each one of the EBNA3 protein with the cellular proteome. From this screen, we have identified a number of relevant interactions between the EBNA3s and cellular proteins, some of them allowing us to formulate new hypothesis to fill in gaps in our knowledge of the mechanisms of action of these proteins. Interestingly, among the new interactors we have identified several transcriptional regulators that bind core promoter elements of a number of

genes known to govern cell cycle progression. In particular, we focus our attention on one of them, the Myc interacting finger protein 1 (Miz-1). Miz-1 is a BTB/POZ domain containing transcription factor that binds to the transcription initiator sites (Inr) in the core promoters of its target genes (32,33). Miz-1 can function as an activator, by recruiting co-activators such as p300 and NPM (33,34) or as a repressor depending on its binding partners. One of the important partner of Miz-1 is c-Myc which by binding Miz-1 has been shown to replace the activating co-factors of Miz-1. In the absence of Myc, Miz-1 activates expression of its target genes in response to anti-mitogenic signals such as TGF- β (33,35), exposure to DNA damage (36) or disturbance of protein translation (34). Thus, whereas Miz-1 alone activates gene expression of target genes such as CDKN1A, CDKN2B and CDKN1C, a Max-c-Myc-Miz-1 complex represses their expression (for a review see(37)). Other transcription factors such as Bcl-6 (38), Gfi-1 (39), HCF-1 (40) and p14Arf (41) have been shown to interact with Miz-1 and repress transcription in a similar way as c-Myc.

We have now demonstrated that all three EBNA3 proteins can interact with Miz-1. We then focused on EBNA-3A to show that its expression in LCLs is responsible for transcriptional repression of specific targets of Miz-1, namely CDKN2B and CDKN1C. Furthermore, we show that EBNA-3A expression induces the relocalization of Miz-1 from the nucleus to the cytoplasm of the cells and represses Miz-1 target gene expression by interfering with recruitment of the NPM co-activator by Miz-1.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

ORFs for full-length EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA3A-Nter (aa 1 to 310), EBNA3B-Nter (aa 1 to 325), EBNA3C-Nter (aa 1 to 320), EBNA3A-Cter (aa 274 to 944), EBNA3B-Cter (aa 279 to 938) and EBNA3C-Cter (aa 284 to 992) in a Gateway recombinational cloning system (42) and deposited in a viral ORF repository, viralORFeome (43). Each ORF was PCR-amplified (with KOD polymerase, Novagen) using *attB1* and *attB2* recombination sites fused to forward and reverse primers from pSG5-EBNA-3A/-3B/-3C (14) then cloned into pDONR207 (BP Clonase, Invitrogen). The ORFs were subsequently transferred (LR Clonase, Invitrogen) into the bait vector, pGBKT7, to be expressed as GAL4-DB fusions in yeast. Expression plasmids for EBNA-3A, -3C, -3B tagged with the Flag epitope were obtained by recombinational cloning from the pDONR207 vectors into expression vectors pCI-neo-3xFlag-gw (Invitrogen). Expression plasmids for the cellular proteins identified in the 2YH screen were obtained either by recombinational cloning using a

human ORFeome library (cloned into pDONR223) into expression vector pDEST-myc (Invitrogen), by RT-PCR amplification from HeLa cells mRNA or were kindly given by Dr. Jiri Lukas (hFBH1), Dr Martin Eilers (Miz-1), Dr. Tang K. Tang (CPAP). EBNA-3A, -3C, -3B tagged with the Myc epitope were obtained by recombinational cloning from the pDONR207 vectors into expression vector pDEST-myc (Invitrogen). Miz-1 deletion mutants and EBNA-3A N- and C-Terminal deletion mutants were generated by cloning the corresponding PCR amplified fragments into pDONR207, then recombination (Gateway recombinational cloning system) into pCI-neo-3xFlag-gw. EBNA-3A deletion mutant Δ 141-238 and EBNA-3A CtBPmut, in which the two amino acids motifs, ALDLS (aa 857-861) and VLDLS (aa 886-890) were substituted by ALDAA and VLDAA respectively, were generated by site-directed mutagenesis (QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene). The *CDKN2B* (-113- +160) Luc reporter construct was a kind gift from Dr Eilers. The CMV-Renilla Luciferase plasmid used as internal control in the transfection has been previously described (44).

Yeast two-hybrid screens

The screens were performed by yeast mating using the AH109 and Y187 yeast strains (Clontech) (45,46). Bait vectors, pGBKT7-EBNA-3A/-3ANter/-3ACter, pGBKT7-EBNA-3B/-3BNter/-3BCter, pGBKT7-EBNA-3C/-3CNter/-3CCter were transformed into AH109 (bait strain). A human lymphoblastoid cell line AD-cDNA library (47) and a human spleen normalized AD-cDNA library (Invitrogen) were transformed into Y187 (prey strain). Single bait strains were mated with prey strain, then diploids were plated on SD-W-L-H + 5 mM 3-AT medium. Positive clones were maintained on this selective medium for 15 days to eliminate any contaminating AD-cDNA plasmid (48). AD-cDNAs were amplified by colony PCR and inserts were sequenced and identified by automatic BLAST as previously described (49).

Cell culture and transfections

HeLa cells and HEK293T cells were grown at 37°C in DMEM supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS) and penicillin-streptomycin. CP364-1 (EBVwt) and CP364-42 (EBV Δ 3A) Lymphoblastoid cell lines (LCLs) (5) were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and penicillin-streptomycin. Plasmid transfection was performed by using either the calcium phosphate precipitate method or by using the PEI transfection reagent (Polysciences). Treatment of LCLs with the c-Myc inhibitor, 10058-F4 (Calbiochem) was performed at a concentration of 64 μ M for 24 hours.

Co-immunoprecipitation assays and western blots

Transfected HEK293T or HeLa cells were harvested from 100 mm dishes 48h post-transfection and lysed in IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150-300 mM NaCl, 1mM DTT and 0.5% Nonidet P-40) plus protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals). For immunoprecipitation of the transiently expressed Flag-tagged proteins, cell extracts were incubated with 30 μ l anti-Flag M2 affinity gel (Sigma) for 4 h at 4°C and immunopurified proteins were analysed by western blotting. Antibodies used for other immunoprecipitations or western blotting analysis were an anti-Flag rabbit polyclonal antibody (Sigma), an anti-Myc (9E10) mAb, an anti-human Miz-1 goat polyclonal antibody (R & D Systems), an anti-EBNA-3A sheep polyclonal antibody (Exalpha biologicals Inc), an anti-Nucleophosmin mAb (Invitrogen) and an anti- α -tubulin mAb (B-5-1-2, Sigma). The appropriate anti-mouse (GE Healthcare), anti-rabbit (GE Healthcare), anti-goat (Santa Cruz Biotechnology, Inc) or anti-sheep (Abcam) horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies were used as secondary antibodies. Myc-tagged proteins were also revealed using a c-Myc (9E10) HRP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Western blots were revealed using ECL (Pierce).

***In vitro* GST-pull down assays**

GST and GST-fusion proteins were purified from *Escherichia coli* BL21 (DE3) codon plus strain extracts, with glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare). Beads carrying the GST or the GST-fusion proteins were equilibrated in TNTB binding buffer (10 mM Tris-HCL pH 8, 250 mM NaCl, 0.1% NP40 and 2 mg/ml BSA) in the presence of protease inhibitors (complete EDTA-free cocktail from Roche Molecular Biochemicals) and incubated with radiolabelled proteins synthesized *in vitro* in the presence of [³⁵S]-methionine using the TnT Coupled Transcription/Translation system (Promega), in TNTB overnight at 4°C. Beads were washed 5X in TNTB buffer without BSA and bound proteins were fractionated by SDS-PAGE and revealed by autoradiography.

RNA extraction and Real-time quantitative RT-PCR from cytoplasmic RNAs

RNA extractions, quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) from cytoplasmic RNAs were performed as previously described (44). For semi-quantitative RT-PCR, RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen). Any contaminating DNA was removed from RNA samples using RQ1 DNase (Promega) to avoid DNA contamination and reversed-transcribed with (dT)₁₆ and 1 μ l of Superscript II enzyme (Invitrogen) in a 20 μ l reaction mix at 42°C for 1 hour. PCRs were performed using the GoTaq®DNA polymerase (Promega) with set of specific primer pairs (Table 1, supplementary data) on various amounts of the RT reaction mixtures to have a linearly increasing signal after 25 PCR cycles. The PCR-amplified fragments were then analyzed on 2% agarose gels. We evaluated the endogenous expression

of β -actin mRNA by RT-PCR (β -Actin forward/ β -Actin reverse: Table 1, supplementary data). Amplification of a single 690-bp DNA fragment corresponding to the β -actin mature mRNA showed that no DNA contamination was present in our RNA preparations.

For real-time PCR, a 20 μ l reaction was prepared with 5 μ l of template cDNA (1/5 to 1/20 diluted), 10 μ l of FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Molecular Biochemicals), 0.3 μ M of each primer and subjected to amplification using a fluorescence thermocycler (Applied Biosystems 7000 Real-time PCR, Foster City, CA) under the following conditions: 10 min at 94°C for initial denaturation, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s, annealing at 60°C for 15s and elongation at 72°C for 30s. This program was followed by a melting curve analysis in order to verify the specificity of the PCR product. PCR results were normalized with the results of parallel amplification of the GAPDH mRNA.

Immunofluorescence assays

For indirect immunofluorescence experiments, an anti-Flag polyclonal antibody (Sigma) and an anti-Myc 9E10 mAb were used as primary antibodies. Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody (Invitrogen) and a Fluorolink Cy3-labeled goat anti-mouse IgG (H+L) (GE Healthcare) were used as secondary antibodies. Cell nuclei were stained by incubation with 0,5 μ g/ml Hoescht 33342 (Sigma).

Luciferase Assays:

Renilla or Firefly luciferase activity from transfected cells was measured in a VeritasTM Luminometer (Turner Biosystems) using the Renilla or Firefly Luciferase Assay system (Promega Madison Co). Luciferase activity was measured for identical amounts of total protein as evaluated by Bradford assay.

RESULTS

Identification of new EBNA-3A, -3B and -3C cellular interacting partners by two-hybrid screen.

We used the yeast two-hybrid (Y2H) system to identify cellular proteins that interact with the EBNA3 family of proteins. Six constructs, encoding full-length, N-Terminal part or C-Terminal part of EBNA-3A, EBNA-3B or EBNA-3C were used to probe both a human lymphoblastoid cell line cDNA library and a human spleen cDNA library. 597 cDNA clones were initially characterized following PCR amplification of the cDNAs and sequencing. From these, a majority were identified as corresponding to RBP-Jk cDNAs. The characterization of the rest of the clones allowed us to identify 36 different putative interactions. We then

undertook to validate the interactions between the putative new cellular partners and each of the EBNA3 proteins by co-immunoprecipitation assays in HEK293T cells, following transfection of expression plasmids encoding full length proteins (Supplementary data, Figure 1). 24 cellular proteins were thus identified as true cellular EBNA3 interacting proteins (Table 1). Most of them appears to interact with the three EBNA3 proteins even though they often have been identified with only one of the EBNA3 in the 2YH screen. In our list of cellular interactors, 6 (namely RBPJ, CTBP1, DNAJB1, ZYX, CENPJ and EIF3F) have been previously described as direct interactors of at least one of the EBNA3 and 18 are new interactors. Interestingly, among these, many have functions linked to transcriptional regulation either directly as DNA-binding transcriptional regulators (RBPJ, NF-YC, ZBTB17, MEOX1) or indirectly as co-activators/repressors of transcriptional regulators (CTBP1, CTBP2, MCRS1) or as components of the ubiquitine/proteasome pathways (FBXO18, SUMO2, COPS5). Among these interactants we were particularly interested in ZBTB17, whose product is more frequently referred to as Miz-1 (for Myc-interacting zinc-finger protein 1). Miz-1 is a POZ-ZF factor that binds to transcription initiator sites (Inr) in the core promoter of target genes among which many are known regulators of the cell cycle i. e. CDKN1A, CDKN2B and CDKN1C. We thus decided to further characterize the interactions between the EBNA3 and Miz-1.

The three EBNA3 proteins interact with the cellular protein Miz-1 both *in cellulo* and *in vitro*.

Miz-1 was identified in our 2YH screen with both EBNA-3B (5 times) or EBNA-3C (once) but not EBNA-3A. The various Miz-1 clones, isolated from the screen, all contained sequences coding for the C-Terminal part of the protein with a variable number of internal zinc finger repeats (9 for the longest one) (Fig. 1A). We then first validated the interactions between a full length Miz-1 protein and the three EBNA3 viral proteins by co-immunoprecipitation in human cells. For this, we transfected HeLa cells with a Myc-tagged full-length Miz-1 expression plasmid, either alone, or together with expression plasmids for each of the Flag-tagged EBNA3. Immunoprecipitations were performed using an M2 anti-Flag mAb affinity gel and the immunoprecipitated complexes were analysed by western blotting. As can be seen Figure 1B, Miz-1 was specifically co-immunoprecipitated with all three EBNA3 proteins.

Protein-protein interactions identified in a 2YH assay are usually considered as direct interactions. To confirm that Miz-1 interacts directly with the EBNA3 proteins we performed *in vitro* binding assays by using a GST-Miz 382-803 (Fig. 1A) fusion protein produced in

bacteria and ³⁵S-EBNA3 proteins that were *in vitro*-translated in reticulocyte lysates. ³⁵S-labelled EBNA-3A, -3B and -3C were incubated with similar amounts of GST or GST-Miz1ΔN protein bound to glutathione sepharose beads. As shown in Figure 1C, EBNA-3A, -3B and -3C were all efficiently retained on GST-Miz1 382-803 but not on GST alone which strongly suggests a direct interaction between Miz-1 and each of the three EBNA3 proteins.

We then decided to characterize further the interaction between Miz-1 and EBNA-3A in a relevant cell model such as a lymphoblastoid cell line immortalised by EBV. For this, we first immunoprecipitated the endogenous Miz-1 protein from an LCL lysate with a specific anti-Miz1 antibody or an anti-Flag antibody as a non-specific control. As can be seen Figure 1D, upper panels, EBNA-3A was specifically co-immunoprecipitated with Miz-1. We then did the reverse experiment, using an anti-EBNA-3A antibody. Accordingly with the previous result, we were able to co-immunoprecipitate Miz-1 together with EBNA-3A (Fig. 1D, lower panels). We thus conclude that the two proteins are able to form a complex in the physiological conditions of a lymphoblastoid cell line immortalised by EBV.

The N-Terminal domain of EBNA-3A interacts with two different domains within Miz-1.

In order to precisely map the domain of interaction of EBNA-3A within Miz-1, we generated a series of Miz-1 deletion mutants (Fig. 2A). Miz 1 and the mutant proteins tagged with a Flag epitope were expressed in HeLa cells together with EBNA-3A tagged with a Myc epitope. We then performed coimmunoprecipitation assays using the anti-FlagM2 affinity gel. We first tested two complementary Miz-1 mutants consisting of the N-Terminal or C-Terminal half of the protein respectively. As can be seen Figure 2B, both full length Miz-1 and Miz-1 CT interact with EBNA-3A, whereas Miz-1NT does not, which corroborate the fact that all the Miz-1 clones isolated in the 2YH screen contained the C-Terminal half of the protein with a various number of the Zinc finger motif. We then tested a series of C-Terminal deletion mutants. As shown Figure 2C, EBNA-3A was co-immunoprecipitated with full length Flag-Miz1 (lane 2) whereas C-Terminal deletion mutants Δ1, Δ2 and Δ3 were very unefficiently co-immunoprecipitated (lanes 3, 4, 5 respectively). By contrast, deletion of the zinc finger within the C-Terminal domain had no effect (lane 6), neither deletion of the domain comprised between aa 638 and 716 which have previously been shown to be responsible for the interaction with c-Myc (32) (Fig 2D, lane 9). Interestingly, we also found an interaction between EBNA-3A and the N-Terminal POZ domain of Miz-1 (Fig 2D, lane 12), although this interaction appears to be masked in deletion mutants Δ1, Δ2 and Δ3 as well

as in Miz-1 NT. Thus, EBNA-3A appears to bind independently to both the N-Terminal POZ domain (aa 1-104) and the extreme C-Terminal domain (aa 739-803) of Miz-1.

We then aimed to determine the interaction domain of EBNA-3A with Miz-1. Since the three EBNA3s were able to interact with Miz-1 we suspected that the interaction domain was localized within the homology domain of the EBNA3s (Fig 3A). We thus made use of an EBNA-3A mutant deleted from aa 141-238 (Fig 3A) to test this hypothesis. As predicted co-immunoprecipitation of this deletion mutant with Miz-1 was drastically reduced (Fig 3B) which suggests that the main interaction domain is indeed comprised in the EBNA3s homology domain.

In order to confirm and precise the interaction domains between EBNA-3A and Miz-1 we performed *in vitro* binding assays using both GST-Miz1 382-803 (Fig 1A) and a fusion protein between GST and the POZ domain of Miz-1 (GST-Miz-POZ). Full-length EBNA-3A and EBNA-3A Δ 141-238 were *in vitro*-translated in reticulocyte lysates in presence of ^{35}S -methionine and the ^{35}S -labelled proteins were incubated with comparable amounts of GST, GST-Miz1 382-803 or GST-Miz-POZ. The results shown Figure 4A clearly demonstrate an interaction between full length EBNA-3A and both the C-Terminal and the POZ domain of Miz-1. However, although the interaction of EBNA-3A Δ 141-238 with GST-Miz-POZ was completely abolished, this mutant was still able to interact with GST-Miz 382-803 indicating that different regions of EBNA-3A are likely to participate in the interaction with either the C-Terminal or the POZ domain of Miz-1. In order to map more precisely these regions, we tested a series of C- and N-Terminal EBNA-3A deletion mutants (Fig 4B). As can be seen in the Figure 4, the smallest N-Terminal deletion mutant that interacts with both GST-Miz 382-803 and GST-Miz-POZ contains the first 224 aa of EBNA-3A. Interestingly, the next mutant which contains the 172 first aa of EBNA-3A was not able to interact with GST-Miz 382-803, whereas an interaction, although weaker could still be detected with GST-Miz-POZ. The results of the interactions using the N-Terminal deletion mutants were not as clear cut as those with the C-Terminal deletion mutants, however they suggest a rapid lost of interaction with GST-Miz-POZ between aa 125 and 225, whereas all the mutants interacted with GST-Miz 382-803 indicating the presence of a second interaction domain in the C-Terminal half of EBNA-3A.

Taken together, these results indicate that EBNA-3A contacts the POZ domain of Miz-1 via a minimum domain comprised between aa 125 to 172 and interacts with the C-Terminal of Miz-1 (aa 716 to 803) via several regions, a major one located in the first 224 N-Terminal amino acids of the protein and an other one in the C-Terminal half of the protein.

EBNA-3A expression induces nuclear re-localization of Miz-1.

Miz-1 has previously been described to be present mostly in the cytoplasm of the cells with only a small proportion of the protein localized in the cell nucleus. However, in the presence of c-Myc, most cells show an exclusive nuclear localization pattern of Miz-1(32). Since EBNA-3A is a nuclear protein, we asked whether expression of EBNA-3A would also induce nuclear re-localization of Miz-1. We thus cotransfected HeLa cells with an expression vector for Miz-1 tagged with a Flag-epitope, together or not with an expression vector for EBNA-3A tagged with a Myc-epitope. Immunofluorescence staining of the cells demonstrate that, as expected, Miz-1 expressed alone is cytoplasmic in a majority of the cells (Fig 5A and C). By contrast, in the presence of EBNA-3A, Miz-1 is found exclusively nuclear in most of the cells expressing EBNA-3A (Fig 5B and C). From these experiments we conclude to a functional interaction between the two protein that lead to re-localization of Miz-1 from the cytoplasm to the nucleus.

EBNA-3A downregulates expression of Miz-1 target genes in LCLs.

Interestingly, Miz-1 has been implicated in transcriptional regulation of several genes that encode regulators of cell cycle progression, such as *CDKN2B* (p15^{INK4B}), *CDKN1A* (p21^{CIP1}) and *CDKN1C* (p57^{KIP2}). We thus asked whether EBNA-3A was able to modulate expression of these genes. For this, we compared the level of transcript expressed in a B-lymphoblastoid cell line (LCL) established with wild type EBV to that expressed in a B-lymphoblastoid cell line established with an EBV mutant lacking the EBNA-3A gene (5). As expected, the EBNA-3A protein was only detected in the LCL infected with wild type EBV and the level of Miz-1 protein was not affected by the presence or absence of EBNA-3A (Fig. 6A). We then analysed the levels of *CDKN2B*, *CDKN1A* and *CDKN1C* transcripts both by standard RT-PCR (Fig. 6B) and by RT-qPCR (Fig. 6C). Interestingly, the levels of *CDKN2B* and *CDKN1C* transcripts were drastically induced in the absence of EBNA-3A. However, we only observed a marginal although reproducible increase in the level of *CDKN1A* transcript. From these experiments we conclude that in the physiological model of lymphoblastoid cell lines, EBNA-3A is able to repress transcription of several Miz-1 target genes.

EBNA-3A represses Miz-1 activation of the *CDKN2B* gene promoter in a CtBP independent manner.

Since EBNA-3A represses the expression of *CDKN2B*, a well known target of Miz1, in the LCL model, we next wanted to determine whether this effect was directly linked to Miz-1 regulation of the *CDKN2B* promoter. For this we used a reporter construct in which the Firefly luciferase gene was placed under the control of a minimal *CDKN2B* promoter (-

113/+160) which contains the Initiator element (Inr) previously shown to recruit Miz-1 onto the promoter by direct binding of the protein to the Inr (33) (Fig 7A). As shown Figure 7B, the reporter construct was activated by Miz-1 in HeLa cells and this activation was efficiently repressed by EBNA-3A but not by EBNA-3A Δ 142-237, an EBNA-3A deletion mutant whose interaction with Miz-1 is drastically altered. These results strongly suggest that EBNA-3A downregulates *CDKN2B* expression by directly interacting with Miz-1.

EBNA-3A has previously been shown to repress transcription by recruiting the transcriptional corepressor, CtBP1 (19). We thus wanted to know whether the interaction of EBNA-3A with CtBP1 was required for repression of Miz-1-dependent transcriptional activation. Since EBNA-3A has been shown to interact with CtBP1 via two motifs, ALDLS and VLDLS, located in the C-Terminal part of EBNA-3A, we generated an EBNA-3A mutant (EBNA-3A CtBPmut) in which these two motifs are specifically mutated as in Hickabottom et al 2002 (19). We then compared the efficiency of this mutant to inhibit Miz-1-dependent transcriptional activation of our reporter construct with that of wild type EBNA-3A. As can be seen Figure 7C, EBNA-3A CtBPmut represses Miz-1 transcriptional activation as efficiently as EBNA-3A, indicating that CtBP does not play an important role in this downregulation.

EBNA-3A downregulation of *CDKN2B* expression is independent of c-MYC.

Regulation by Miz-1 of Inr containing promoters involves a complex network of interactions with multiple cellular proteins acting either as co-activators or co-repressors. Among these, c-Myc has been shown to be an important downregulator of *CDKN2B* expression by direct interaction with Miz-1. Since the EBNA3 proteins have been previously shown to inhibit *c-MYC* transcription (50) and, at least EBNA-3C, has been reported to directly interact with c-Myc (51), we wanted to know whether EBNA-3A-induced downregulation of *CDKN2B* expression might be due to an indirect effect via c-Myc. To examine this eventuality, we quantified the level of expression of *CDKN2B* in LCLs treated or not with a specific inhibitor of c-Myc, the (Z,E)-5-(4-Ethylbenzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-yl or 10058-F4 (52). As can be seen Figure 8 and as expected, following treatment of both LCLs (infected with EBV_{wt} or EBV _{Δ EBNA-3A} respectively) by the 10058-F4, the level of *CDKN2B* mRNA was increased (between 2.4 to 3 times). Interestingly, the difference of level of *CDKN2B* transcripts between normal LCL and LCL infected with EBV _{Δ EBNA-3A} remains very similar, whether the cells were treated or not with 10058-F4, indicating that downregulation of *CDKN2B* expression by c-Myc or EBNA-3A are mediated by independent mechanisms.

EBNA-3A inhibits Miz-1 interaction with its coactivator Nucleophosmin (NPM).

Several cellular co-activators of Miz-1 have been previously identified, among which nucleophosmin/B23 (NPM)(34). Interestingly, the POZ domain of Miz-1 appears to be necessary for interaction with NPM. Since EBNA-3A also interacts with the POZ domain of Miz-1, we asked whether EBNA-3A could interfere with Miz-1/NPM interaction. To explore this hypothesis, we co-immunoprecipitated Miz-1/NPM complexes from LCLs infected with EBV_{wt} or with EBV_{ΔEBNA-3A}. As can be seen Figure 9A, Miz-1 was expressed and immunoprecipitated in similar amounts from both LCLs. Interestingly, NPM was efficiently co-immunoprecipitated from the EBV_{ΔEBNA-3A} infected LCL, whereas very little NPM was found associated with Miz-1 in the LCL infected with EBV_{wt} although the overall level of NPM was identical in both cell lines. It is to be noted that NPM itself does not appear to interact with EBNA-3A (Fig. 9B). These results strongly suggest that EBNA-3A can inhibit Miz-1 activation of *CDKN2B* by preventing Miz-1 to interact with its co-activator, NPM.

DISCUSSION

In this study, we have developed a large-scale two hybrid screen to identify the main cellular partners of the EBNA3 proteins. We were able to identify both previously well characterized cellular partners and a number of new interactors. The interaction between the three EBNA3 proteins with RBP-Jk/CBF-1 (*RBPJ*) has already been largely documented (53) (14) (54) (50). Similarly, the interaction of both EBNA-3A and -3C with the CtBP1 coactivator has been well characterized (19) (20) (55). Besides, we also found an interaction of EBNA-3A with CtBP2, a protein highly related to CtBP1 (80% of homology between the two proteins) (56). Whether the roles of CtBP1 and CtBP2 are redundant or complementary will have to be investigated further. EBNA-3A was previously found, by co-immunoprecipitation experiments, to form a complex with HSP40 (DNAJB1) in LCLs (57). The fact that we identify this cellular partner by 2YH suggests a direct interaction between the two proteins. Moreover, we show that EBNA-3B and -3C can also be found in a complex with HSP40. The ZYXIN had previously been identified in a 2YH screen using EBNA-3B as a bait by Calderwood et al (58). Our 2YH screen has also identified the ZYXIN with EBNA-3B as a bait. Furthermore, we validated this interaction by coimmunoprecipitation with both EBNA-3B and EBNA-3A. Finally, both, CENPJ and EIF3F were previously identified in a 2YH screen using EBNA-3C as a bait (59). We have now validated these interactions with EBNA-3C and also found an interaction with EBNA-3A for CENPJ and with both EBNA-3A and EBNA-3B for EIF3F.

Besides these already reported interactants we have identified 18 new cellular partners for the EBNA3s, most of them interacting with the three proteins. Among these interactants, several are known to be part of protein complexes previously known to be targeted by the EBNA3s. This is the case for instance for STIP1 (also called HOP for HSC70/HSP90-organizing protein) which facilitates the association of the HSP70/HSP90 chaperone complex (60), since EBNA-3A has previously been found to interact with HSP70 and HSP90 (57). This is also the case for FBXO18 (F-box protein, helicase, 18) which is known to form a SCF (SKP1/Cullin/F-box) complex with human CUL1 and ROC1 (61). Interestingly, EBNA-3C has been shown before to interact with the SCF^{SKP2} complex (10) (11). EBNA-3C (and EBNA-3A) could thus interact with several different SCF complexes.

Most importantly, among the newly identified partners of the EBNA3s, several proteins are known to play a role in transcriptional regulation. This is the case for MEOX1, which has been recently found to play a role in the transcriptional activation of *CDKN2A* (p16^{INK4A}) in a DNA binding dependent manner (62). MCRS1 is a putative regulatory component of the chromatin remodeling INO80 complex which is involved in transcriptional regulation, DNA replication and DNA repair (63). NF-YC is one of the subunit of Nuclear transcription factor Y (NF-Y), a ubiquitous heteromeric transcription factor composed of three subunits, NF-YA, NF-YB and NF-YC, that binds CCAAT elements in the core promoter of many genes (for a review (64)). Interestingly, it has been shown that EBNA-3C and EBNA-3A cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim in BL cell lines (31) and that EBNA-3C can be recruited to the Bim promoter at proximity of the transcription start site (TSS) (23). Moreover, it has recently been shown, in rat sympathetic neurons, that the Bim core promoter is regulated by NF-Y via a CCAAT box proximal to the TSS (65). Since the CCAAT box found in the rat Bim promoter is conserved in the human gene promoter, it is likely that EBNA-3C (and EBNA-3A) are specifically recruited onto the Bim promoter by interacting with NF-Y bound on the CCAAT box. Work is currently under progress in our laboratory to demonstrate whether this is indeed the case.

Finally, we also identified the protein Miz-1 as a new interactor of the three EBNA3s. Similar to NF-Y, Miz-1 is a transcriptional regulator that binds a core promoter element, the Initiator element (Inr). Inrs overlap the TSS of many cellular genes, among which some, involved in cell control (*CDKN1A*, *CDKN2B* and *CDKN1C* for instance) or apoptosis regulation (*BCL2*), are particularly relevant to the known functions of the EBNA3s. We thus

focused our attention on the functional role of this particular interaction in B-cell immortalization by EBV. Beforehand, we validated the interactions between the three EBNA3s and Miz-1 both by co-immunoprecipitation assays in HeLa cells and by GST-pull down assays. We then focused our study more specifically on EBNA-3A. We first demonstrated by reciprocal co-immunoprecipitation assays that endogenous EBNA-3A and Miz-1 form a complex in the physiological model of LCLs. We then used a combination of co-immunoprecipitation and GST-pull down assays to determine the domains of each protein involved in the interaction. Taken together, the results indicate that several domains in each proteins are involved in the interaction. First, EBNA-3A interacts both with the N-Terminal POZ domain of Miz-1 and with a C-Terminal domain located between amino-acids 740 and 803 of the protein. The main interaction domain in EBNA-3A is in the N-Terminal of the protein and corresponds to the so called homology domain commun to the three EBNA3s which is not surprising since Miz-1 interacts with the three EBNA3s. However, although this domain appears to be involved in contacting both the POZ domain and the C-Terminal domain of Miz-1, the subdomains involved are likely to be different since the interaction with the C-Terminal of Miz-1 appears to be completely lost in the C-Terminal deletion mutant, EBNA-3A 1-172, whereas this mutant still interacts with the POZ domain. In addition, deletion of the N-Terminal homology completely abolishes the interaction with the POZ domain but not with the C-Terminal domain of Miz-1, suggesting that this domain also contacts Miz-1 via its C-Terminal. Thus, interaction between the two proteins appear to be particularly complex and will need structural studies to be characterize further.

Once the interaction between Miz-1 and EBNA-3A confirmed by these various biochemical experiments, we wanted to visualize an eventual colocalization of the two proteins in the cells. Interestingly, although EBNA-3A is a nuclear protein, Miz-1 is a nucleocytoplasmic protein (32) whose cytoplasmic localization has been reported to be regulated via microtubule association (66,67). Moreover, Miz-1 has been found to be re-localized to the nucleus by c-Myc (32). Our own experiments reveal that in a similar way to c-Myc, EBNA-3A is able to re-localize Miz-1 from the cytoplasm to the nucleus of transfected cells. In addition on providing some information on a possible mechanism of action of EBNA-3A, this observation give us some more evidence of a physical interaction between the two proteins, in cellulo.

The best characterized target genes of Miz-1 are those encoding the cyclin-dependent kinase inhibitors p15^{INK4B} (*CDKN2B*), p21^{CIP1} (*CDKN1A*) and p57^{KIP2} (*CDKN1C*) (33) (36). We thus asked whether transcription of these genes could be affected by EBNA-3A. Since, c-Myc is an important regulator of Miz-1 target genes, we choose not to work in Burkitt's lymphoma cell lines because of the known deregulation of c-Myc in these cells, but instead to use LCLs infected with either wild type EBV or an EBV recombinant deficient in EBNA-3A expression (5). Comparison of the transcripts levels for these three genes clearly show that EBNA-3A's presence correlates with a strong repression of *CDKN2B* and *CDKN1C* transcripts. Concerning *CDKN1A*, the results were less clear, although we repeatedly observed a slight repression in the presence of EBNA-3A. Interestingly, in a recent paper Yenamandra et al (68), by using these same wt and Δ EBNA-3A LCLs, found a 8 times decrease in the level of *CDKN1A* transcript in the presence of EBNA-3A. The promoter of *CDKN1A* is very complex and known to be submitted to many different regulations implicating many transcription factors. It is thus possible that different culture conditions might affect the level of expression of *CDKN1A* and that in certain conditions the specific variations linked to the effect of Miz-1-dependent regulation is not a dominant effect. In any case, this difference in the level of *CDKN1A* transcripts by Yenamandra et al confort a role of EBNA-3A in *CDKN1A* regulation.

In order to demonstrate that the EBNA-3A regulation of these CDKI transcripts is mediated by Miz-1 interaction, we studied the capacity of EBNA-3A to repress Miz-1-mediated activation of a minimum *CDKN2B* promoter containing mostly the Inr element. In this simplified context, we were able to demonstrate the implication of Miz-1 in the regulation of the *CDKN2B* promoter by EBNA-3A. In a similar way we were able to show that EBNA-3A also represses Miz-1 activation of *CDKN1A* minimum promoter (data not shown) which reinforce the above observations that in certain conditions EBNA-3A can downregulate *CDKN1A* expression.

Finally, we were interested to investigate the mechanisms involved in the repression of Miz-1 transcriptional activation. First, by using a specific inhibitor of c-Myc we demonstrated, at least in the case of *CDKN2B*, that EBNA-3A's repressive effect is mostly independent from that of c-Myc. Second, the co-repressor CtBP which has previously been reported to be essential for GAL4-EBNA-3A dependent transcriptional activation (19), does not appear to be involved in the repression of Miz-1 transcriptional activation of its target

genes. Finally, we investigated the capacity of EBNA-3A to interfere with Miz-1 co-activators. Interestingly, we were able to demonstrate that EBNA-3A inhibits Miz-1 interaction with its co-activator, NPM. This result is in accordance with our mapping of the EBNA-3A interaction domain to the POZ domain of the protein which happens to be also the interaction domain with NPM (34).

The EBNA3 proteins have long been known for their capacity as transcriptional regulators, however, up to now only RBP-Jk was reported as a DNA-binding protein susceptible to direct the EBNA-3s onto specific promoter elements. On the other hand transcriptomic studies have recently revealed the extent of the impact of the EBNA3s on cellular transcription (69) (57) (70) (71) (5). Here we described for the first time the interaction of the EBNA3s with two major regulator of transcription, the DNA-binding proteins NF-Y and Miz-1, that respectively bind regulator elements, the CCAAT box and the Inr, that are constitutive of the core promoters of many cellular genes. Thus, by interacting with such crucial factors, the EBNA3s are likely to induce a complete reprogramming of transcription in B cells following infection by EBV.

FUNDING

This work was supported by the ‘Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale’ (INSERM), ‘the Cluster de Recherche Rhône-Alpes en Infectiologie’ and ‘the Ligue Contre le Cancer, comité du Rhône’. Q. B. has been recipient of fellowships from the ‘Ministère de la Recherche et de la Technologie’ (MRT) and of the ‘Association pour la Recherche contre le Cancer’ (ARC); T. D. is the recipient of a fellowship from the ‘Ministère de l’enseignement et de la Recherche scientifique (MENRS); E. M. is a CNRS scientist.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Jiri Lukas, Dr Martin Eilers and Dr. Tang K. Tang (CPAP) for providing plasmids pCDNA3-Miz-1, pFlag-CMV2-FBH1 and pEGFP-C1-CPAP respectively. We acknowledge the contribution of the “Genetic Analysis and Vectorology” platform (B. Blanquier) and the “Platim” microscope facilities of the SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (US8/UMS3444).

REFERENCES

1. Crawford, D.H. (2001) Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 461-473.
2. Kieff, E. and Rickinson, A.B. (2007) In Knipe, D. M. (ed.), *Fields Virology*. fifth ed. Wolters Kluwer/ Lippincott Williams &Wilkins, Vol. 2, pp. 2063-2654.
3. Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N. and Cullen, B.R. (2006) Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog*, **2**, e23.
4. Tomkinson, B., Robertson, E. and Kieff, E. (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.*, **67**, 2014-2025.
5. Hertle, M.L., Popp, C., Petermann, S., Maier, S., Kremmer, E., Lang, R., Mages, J. and Kempkes, B. (2009) Differential gene expression patterns of EBV infected EBNA-3A positive and negative human B lymphocytes. *PLoS Pathog*, **5**, e1000506.
6. Maruo, S., Johannsen, E., Illanes, D., Cooper, A. and Kieff, E. (2003) Epstein-Barr Virus nuclear protein EBNA3A is critical for maintaining lymphoblastoid cell line growth. *J Virol*, **77**, 10437-10447.
7. Maruo, S., Wu, Y., Ishikawa, S., Kanda, T., Iwakiri, D. and Takada, K. (2006) Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C is required for cell cycle progression and growth maintenance of lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 19500-19505.
8. Yi, F., Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Knight, J.S., Cai, Q., Choudhuri, T. and Robertson, E.S. (2009) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C targets p53 and modulates its transcriptional and apoptotic activities. *Virology*, **388**, 236-247.
9. Knight, J.S., Sharma, N., Kalman, D.E. and Robertson, E.S. (2004) A cyclin-binding motif within the amino-terminal homology domain of EBNA3C binds cyclin A and modulates cyclin A-dependent kinase activity in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol*, **78**, 12857-12867.
10. Knight, J.S., Sharma, N. and Robertson, E.S. (2005) Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 18562-18566.
11. Knight, J.S., Sharma, N. and Robertson, E.S. (2005) SCFSkp2 complex targeted by Epstein-Barr virus essential nuclear antigen. *Mol Cell Biol*, **25**, 1749-1763.

12. Marshall, D. and Sample, C. (1995) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a transcriptional regulator. *J. Virol.*, **69**, 3624-3630.
13. Bain, M., Watson, R.J., Farrell, P.J. and Allday, M.J. (1996) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a powerful repressor of transcription when tethered to DNA. *J. Virol.*, **70**, 2481-2489.
14. Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A. and Manet, E. (1996) Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J κ -EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J κ to DNA. *J. Virol.*, **70**, 5909-5915.
15. Bourillot, P.-Y., Waltzer, L., Sergeant, A. and Manet, E. (1998) Transcriptional repression by the Epstein-Barr virus EBNA3A protein tethered to DNA does not require RBP-J κ . *J. Gen. Virol.*, **79**, 363-370.
16. Cludts, I. and Farrell, P.J. (1998) Multiple functions within the Epstein-Barr virus EBNA-3A protein. *J. Virol.*, **72**, 1862-1869.
17. Cotter, M.A., 2nd and Robertson, E.S. (2000) Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of epstein-barr nuclear antigen 3C with prothymosin alpha. *Mol Cell Biol*, **20**, 5722-5735.
18. Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R. and Robertson, E.S. (2002) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J Virol*, **76**, 4699-4708.
19. Hickabottom, M., Parker, G.A., Freemont, P., Crook, T. and Allday, M.J. (2002) Two non-consensus sites in the Epstein-Barr virus oncoprotein EBNA3A co-operate to bind the co-repressor CtBP. *J Biol Chem*, **7**, 7.
20. Touitou, R., Hickabottom, M., Parker, G., Crook, T. and Allday, M.J. (2001) Physical and functional interactions between the corepressor CtBP and the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C. *J Virol*, **75**, 7749-7755.
21. Radkov, S.A., Touitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T. and Allday, M.J. (1999) Epstein-barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase To repress transcription [In Process Citation]. *J Virol*, **73**, 5688-5697.
22. Knight, J.S., Lan, K., Subramanian, C. and Robertson, E.S. (2003) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *J Virol*, **77**, 4261-4272.

23. Paschos, K., Smith, P., Anderton, E., Middeldorp, J.M., White, R.E. and Allday, M.J. (2009) Epstein-barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpG methylation of the tumour suppressor gene Bim. *PLoS Pathog*, **5**, e1000492.
24. Le Roux, A., Kerdiles, B., Walls, D., Dedieu, J.F. and Perricaudet, M. (1994) The Epstein-Barr virus nuclear antigens EBNA-3A, 3B, 3C repress EBNA-2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology*, **205**, 596-602.
25. Radkov, S.A., Bain, M., Farrell, P.J., West, M., Rowe, M. and Allday, M.J. (1997) Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J. Virol.*, **71**, 8552-8562.
26. Parker, G.A., Crook, T., Bain, M., Sara, E.A., Farrell, P.J. and Allday, M.J. (1996) Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene*, **13**, 2541-2549.
27. Parker, G.A., Touitou, R. and Allday, M.J. (2000) Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene*, **19**, 700-709.
28. Kelly, G.L., Milner, A.E., Tierney, R.J., Croom-Carter, D.S., Altmann, M., Hammerschmidt, W., Bell, A.I. and Rickinson, A.B. (2005) Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. *J Virol*, **79**, 10709-10717.
29. Kelly, G.L., Milner, A.E., Baldwin, G.S., Bell, A.I. and Rickinson, A.B. (2006) Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 14935-14940.
30. Leao, M., Anderton, E., Wade, M., Meekings, K. and Allday, M.J. (2007) Epstein-barr virus-induced resistance to drugs that activate the mitotic spindle assembly checkpoint in Burkitt's lymphoma cells. *J Virol*, **81**, 248-260.
31. Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, R.E. and Allday, M.J. (2008) Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene*, **27**, 421-433. Epub 2007 Jul 23.
32. Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F. and Eilers, M. (1997) An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J*, **16**, 5672-5686.

33. Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Möröy, T., Bartek, J., Massagué, J., Hänel, F. *et al.* (2001) Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol*, **3**, 392-399.
34. Wanzel, M., Russ, A.C., Kleine-Kohlbrecher, D., Colombo, E., Pelicci, P.G. and Eilers, M. (2008) A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat Cell Biol*, **10**, 1051-1061.
35. Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M. and Massague, J. (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol*, **3**, 400-408.
36. Seoane, J., Le, H.-V. and Massagué, J. (2002) Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature*, **419**, 729-734.
37. Adhikary, S. and Eilers, M. (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 635-645.
38. Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H. and Dalla-Favera, R. (2005) BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nature Immunology*, **6**, 1054-1060.
39. Basu, S., Liu, Q., Qiu, Y. and Dong, F. (2009) Gfi-1 represses CDKN2B encoding p15INK4B through interaction with Miz-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 1433-1438.
40. Piluso, D., Bilan, P. and Capone, J.P. (2002) Host cell factor-1 interacts with and antagonizes transactivation by the cell cycle regulatory factor Miz-1. *J Biol Chem*, **277**, 46799-46808.
41. Herkert, B., Dwertmann, A., Herold, S., Abed, M., Naud, J.F., Finkernagel, F., Harms, G.S., Orian, A., Wanzel, M. and Eilers, M. (2010) The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. *J Cell Biol*, **188**, 905-918.
42. Walhout, A.J., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., van den Heuvel, S. and Vidal, M. (2000) GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol*, **328**, 575-592.
43. Pellet, J., Tafforeau, L., Lucas-Hourani, M., Navratil, V., Meyniel, L., Achaz, G., Guironnet-Paquet, A., Aublin-Gex, A., Caignard, G., Cassonnet, P. *et al.* (2010) ViralORFeome: an integrated database to generate a versatile collection of viral ORFs. *Nucleic Acids Res.*, **38**, D371-378.

44. Ricci, E.P., Mure, F., Gruffat, H., Decimo, D., Medina-Palazon, C., Ohlmann, T. and Manet, E. (2009) Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4932-4943.
45. Albers, M., Kranz, H., Kober, I., Kaiser, C., Klink, M., Suckow, J., Kern, R. and Koegl, M. (2005) Automated yeast two-hybrid screening for nuclear receptor-interacting proteins. *Mol. Cell Proteomics*, **4**, 205-213.
46. Tafforeau, L., Rabourdin-Combe, C. and Lotteau, V. (2012) In Suter, B. W., Erich E. (Eds.) (ed.), *Two Hybrid Technologies*. Springer Protocols ed. Humana Press.
47. Juillard, F., Bazot, Q., Mure, F., Tafforeau, L., Macri, C., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., Manet, E. and Gruffat, H. (2012) Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs. *Nucleic Acids Res.*
48. Vidalain, P.O., Boxem, M., Ge, H., Li, S. and Vidal, M. (2004) Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods*, **32**, 363-370.
49. Pellet, J., Meyniel, L., Vidalain, P.O., de Chasse, B., Tafforeau, L., Lotteau, V., Rabourdin-Combe, C. and Navratil, V. (2009) pISTil: a pipeline for yeast two-hybrid Interaction Sequence Tags identification and analysis. *BMC Res. Notes*, **2**, 220.
50. Cooper, A., Johannsen, E., Maruo, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Davidson, D. and Kieff, E. (2003) EBNA3A Association with RBP-J{ κ } Down-Regulates c-myc and Epstein-Barr Virus-Transformed Lymphoblast Growth. *J. Virol.*, **77**, 999-1010.
51. Bajaj, B.G., Murakami, M., Cai, Q., Verma, S.C., Lan, K. and Robertson, E.S. (2008) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J Virol*, **82**, 4082-4090.
52. Yin, X., Giap, C., Lazo, J.S. and Prochownik, E.V. (2003) Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function. *Oncogene*, **22**, 6151-6159.
53. Young, D.B., Krauer, K., Kienzl, N. and Sculley, T. (1997) Both A type and B type Epstein-Barr virus nuclear antigen 6 interact with RBP-2N. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1671-1674.
54. Krauer, K.G., Belzer, D.K., Liaskou, D., Buck, M., Cross, S., Honjo, T. and Sculley, T. (1998) Regulation of interleukin-1 β transcription by Epstein-Barr virus involves a number of latent proteins via their interaction with RBP. *Virology*, **252**, 418-430.
55. Skalska, L., White, R.E., Franz, M., Ruhmann, M. and Allday, M.J. (2012) Epigenetic repression of p16(INK4A) by latent Epstein-Barr virus requires the interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP. *PLoS Pathog*, **6**, e1000951.

56. Katsanis, N. and Fisher, E.M. (1998) A novel C-Terminal binding protein (CTBP2) is closely related to CTBP1, an adenovirus E1A-binding protein, and maps to human chromosome 21q21.3. *Genomics*, **47**, 294-299.
57. Young, P., Anderton, E., Paschos, K., White, R. and Allday, M.J. (2008) Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA) 3A induces the expression of and interacts with a subset of chaperones and co-chaperones. *J Gen Virol*, **89**, 866-877.
58. Calderwood, M.A., Venkatesan, K., Xing, L., Chase, M.R., Vazquez, A., Holthaus, A.M., Ewence, A.E., Li, N., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, D.E. *et al.* (2007) Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7606-7611.
59. Lin, J., Johannsen, E., Robertson, E. and Kieff, E. (2002) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J Virol*, **76**, 232-242.
60. Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D. and Toft, D.O. (1998) Hop modulates Hsp70/Hsp90 interactions in protein folding. *J Biol Chem*, **273**, 3679-3686.
61. Kim J, Kim JH, Lee SH, Kim DH, Kang HY, Bae SH, Pan ZQ and YS., S. (2002) The novel human DNA helicase hFBH1 is an F-box protein. *J. Biol. Chem.*, **277**, 24530-24537.
62. Douville, J.M., Cheung, D.Y., Herbert, K.L., Moffatt, T. and Wigle, J.T. Mechanisms of MEOX1 and MEOX2 regulation of the cyclin dependent kinase inhibitors p21 and p16 in vascular endothelial cells. *PLoS One*, **6**, e29099.
63. Jin, J., Cai, Y., Yao, T., Gottschalk, A.J., Florens, L., Swanson, S.K., Gutierrez, J.L., Coleman, M.K., Workman, J.L., Mushegian, A. *et al.* (2005) A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex. *J Biol Chem*, **280**, 41207-41212.
64. Dolfini, D., Gatta, R. and Mantovani, R. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **47**, 29-49.
65. Hughes, R., Kristiansen, M., Lassot, I., Desagher, S., Mantovani, R. and Ham, J. NF-Y is essential for expression of the proapoptotic bim gene in sympathetic neurons. *Cell Death Differ*, **18**, 937-947.
66. Ziegelbauer, J., Shan, B., Yager, D., Larabell, C., Hoffmann, B. and Tjian, R. (2001) Transcription factor MIZ-1 is regulated via microtubule association. *Mol Cell*, **8**, 339-349.

67. Ziegelbauer, J., Wei, J. and Tjian, R. (2004) Myc-interacting protein 1 target gene profile: a link to microtubules, extracellular signal-regulated kinase, and cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 458-463.
68. Yenamandra, S.P., Hellman, U., Kempkes, B., Darekar, S.D., Petermann, S., Sculley, T., Klein, G. and Kashuba, E. (2010) Epstein-Barr virus encoded EBNA-3 binds to vitamin D receptor and blocks activation of its target genes. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 4249-4256.
69. Zhao, B., Mar, J.C., Maruo, S., Lee, S., Gewurz, B.E., Johannsen, E., Holton, K., Rubio, R., Takada, K., Quackenbush, J. *et al.* (2010) Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C regulated genes in lymphoblastoid cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 337-342.
70. White, R.E., Groves, I.J., Turro, E., Yee, J., Kremmer, E. and Allday, M.J. (2010) Extensive co-operation between the Epstein-Barr virus EBNA3 proteins in the manipulation of host gene expression and epigenetic chromatin modification. *PLoS One*, **5**, e13979.
71. McClellan, M.J., Khasnis, S., Wood, C.D., Palermo, R.D., Schlick, S.N., Kanhere, A.S., Jenner, R.G. and West, M.J. Downregulation of integrin receptor-signaling genes by Epstein-Barr virus EBNA 3C via promoter-proximal and -distal binding elements. *J Virol*, **86**, 5165-5178.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: The EBNA3 proteins interacts with the cellular protein Miz-1. (A) Schematic representation of Miz-1. The dark box corresponds to the POZ domain of the protein, dark gray boxes to zinc finger motifs. Miz-1 382-803 corresponds to the protein expressed from the longest cDNA isolated in the 2YH screen. (B) Expression plasmids for Flag.EBNA-3A, Flag.EBNA-3B, Flag.EBNA-3C and Myc.Miz-1 were transfected into HeLa cells as indicated. Cellular extracts were immunoprecipitated with an M2 anti-Flag mAb affinity gel and the immunoprecipitated complexes were analysed by western blotting using an anti-Flag polyclonal Flag antibody to detect the EBNA3 proteins (top panel) or an anti-Miz polyclonal antibody (bottom panel). Input correspond to 8% of the cell extract used for immunoprecipitation. (C) ³⁵S-labeled EBNA-3A, EBNA-3B or EBNA-3C were incubated with purified GST or GST-Miz-1 382-803 bound to glutathione sepharose beads. The bound proteins were analysed by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. In lane 1, the

equivalent of 1/12 of the EBNA-3A, EBNA-3B or EBNA-3C-expressing rabbit reticulocyte lysate used in each assay was loaded onto the gel. (D) EBNA-3A or Miz-1 were immunoprecipitated (IP) from a lymphoblastoid cell line protein extract using anti-EBNA-3A or anti-Miz-1 specific polyclonal antibodies as indicated or with an anti-Flag antibody as control. Immuno and co-immunoprecipitated EBNA-3A and Miz-1 proteins were analysed by western blotting. Input correspond to 25 % of the cell extract used for immunoprecipitation.

Figure 2: EBNA-3A interacts with two distinct domains of Miz1. (A) Schematic representation of Miz-1 and Miz-1 deletion mutants. (B, C and D) Expression plasmids for Myc.EBNA-3A and Flag.Miz-1 or Flag.Miz-1 deletion mutants were transfected into HeLa cells as indicated. Cellular extracts were immunoprecipitated with an M2 anti-Flag mAb affinity gel and the immunoprecipitated complexes were analysed by western blotting using an anti-Flag polyclonal Flag antibody to detect Miz-1 and the Miz-1 deletion mutants or an anti-Myc 9E10 monoclonal antibody to detect Myc-EBNA-3A. Input correspond to 8% of the cell extract used for immunoprecipitation.

Figure 3: Miz-1 interacts principally with the EBNA3 homology domain of EBNA-3A. (A) Schematic representation of EBNA-3A and EBNA-3A deletion mutant. (B) Expression plasmids for Flag-Miz-1 and Myc-EBNA-3A or Myc-EBNA-3A Δ 141-238 were transfected into HeLa cells as indicated. Cellular extracts were immunoprecipitated with an M2 anti-Flag mAb affinity gel and the immunoprecipitated complexes were analysed by western blotting using an anti-Flag polyclonal Flag antibody to detect Miz-1 or an anti-Myc 9E10 monoclonal antibody to detect Myc-EBNA-3A and Myc-EBNA-3A Δ 141-238. Input correspond to 8% of the cell extract used for immunoprecipitation.

Figure 4: The POZ domain and the C-Terminal domain of Miz-1 interact with different regions of EBNA-3A. (A) ^{35}S -labeled EBNA-3A or EBNA-3A deletion mutants depicted on the left of the Figure were incubated with purified GST (lanes 2), GST-Miz-1 382-803 or GST-Miz-POZ (lanes 3) bound to glutathione sepharose beads. The bound proteins were analysed by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. In lane 1, the equivalent of 1/12 of the EBNA-3A or EBNA-3A deletion mutants-expressing rabbit reticulocyte lysate used in each assay was loaded onto the gel. (B) As in A except for the use of Flag-tagged EBNA-3A and EBNA-3A deletion mutants.

Figure 5. EBNA-3A relocates Miz-1 into the nucleus. Expression plasmids for Flag-Miz-1 alone (A) or Flag-Miz-1 together with Myc-EBNA-3A were transfected into HeLa cells (B and C). Proteins were visualized by indirect immunofluorescence using an anti-Flag polyclonal Ab (for detection of Miz-1) (panels b) and an anti-tag Myc polyclonal antibody (for detection of EBNA-3A) (panels c). A Fluorolink Cy3-labeled goat anti-mouse IgG (H+L) antibody and an Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody were used as secondary antibodies respectively. Cell nuclei were stained with Hoechst 33258 (Sigma) (panels a). White arrows indicate cells in which both Miz-1 and EBNA-3A are expressed. (C) Quantification of the number of cells in which Miz-1 is strictly nuclear or nucleocytoplasmic in conditions where Miz-1 is expressed either alone (lane 1) or together with EBNA-3A (lane 2).

Figure 6. *CDKN2B* and *CDKN1C* expression in lymphoblastoid cell lines is highly dependent on the presence or absence of EBNA-3A. (A) EBNA-3A and Miz-1 protein levels in LCL infected with wild type EBV (LCL) or with the recombinant EBV deleted from the EBNA-3A gene, were analysed by western blotting using a specific anti-EBNA-3A polyclonal antibody, a Miz-1 specific polyclonal antibody and an anti- α -tubulin mAb as internal control as indicated. (B) Analysis of *CDKN1A*, *CDKN2B* and *CDKN1C* mRNA expression levels from a normal LCL or an LCL infected with a Δ EBNA-3A recombinant virus by RT-PCR using actin mRNA as an internal control (C) Quantification of *CDKN1A*, *CDKN2B* and *CDKN1C* mRNA levels from a normal LCL or an LCL infected with a Δ EBNA-3A recombinant virus by real time RT-PCR. Histogram bars represent values relative to housekeeping gene *GAPDH*. The error bars represent standard deviation from three replicate assays from two different cDNAs.

Figure 7. EBNA-3A activates the *CDKN2B* minimum promoter. (A) schematic representation of the *CDKN2B*p Luciferase reporter construct. The Firefly luciferase reporter gene was placed under the control of a -113/+160 bp fragment from the human *CDKN2B* promoter. Inr: Initiator element. The arrow indicates the start of the transcription. (B and C) the *CDKN2B*p-Luc construct was transfected into HeLa cells, together with a CMV-renilla LUC plasmid as internal control and expression plasmids for EBNA-3A, EBNA-3A Δ 141-238 or EBNA-3A CtBPmut and Miz-1 as indicated in the Figure. The results are plotted relative to the co-transfected CMV-renilla-LUC plasmid. The error bars represent standard deviations from three replicate assays. Protein expression levels were controlled by western

blotting using an anti-EBNA-3A or an anti-Miz-1 antibody for one representative experiment (bottom panels).

Figure 8. EBNA-3A-dependent downregulation of *CDKN2B* expression is independent of c-Myc. A normal LCL or an LCL infected with a Δ EBNA-3A recombinant virus were treated or not with the 10058-F4 c-Myc inhibitor. Quantification of *CDKN2B* mRNA levels was performed by real time RT-PCR. Histogram bars represent values relative to housekeeping gene *GAPDH*. The error bars represent standard deviation from three replicate assays from two different cDNAs.

Figure 9. EBNA-3A inhibits Miz-1 interaction with its coactivator Nucleophosmin. (A) Miz-1 was immunoprecipitated from either a normal LCL or an LCL infected with an EBV $_{\Delta$ EBNA-3A recombinant virus, with an anti-Miz-1 specific polyclonal antibody or with a control unrelated antibody. Immunoprecipitated Miz-1 and co-immunoprecipitated Nucleophosmin (NPM) proteins were analysed by western blotting. Input correspond to 5 % of the cell extract used for immunoprecipitation. (B) Expression plasmids for Myc-EBNA-3A, Flag-Miz-1 or Flag-NPM were transfected into HeLa cells as indicated in the Figure. Cellular extracts were immunoprecipitated with an M2 anti-Flag mAb affinity gel and the immunoprecipitated complexes were analysed by western blotting using an anti-Flag polyclonal Flag antibody to detect Miz-1 or NPM or an anti-Myc 9E10 monoclonal antibody to detect EBNA-3A. Input correspond to 8% of the cell extract used for immunoprecipitation.

SUPPLEMENTARY DATA

Legend to Figure 1: Validation of the two-hybrid screen data by co-immunoprecipitations in human cells.

Expression plasmids for Flag.EBNA-3A, Flag.EBNA-3B, Flag.EBNA-3C and the Myc- Or GFP-tagged full length coding sequence for the putative partner were transfected into HEK293T cells as indicated in each Figure. Cellular extracts were immunoprecipitated with an M2 anti-Flag mAb affinity gel and the immunoprecipitated complexes were analysed by western blotting using an anti-Flag polyclonal Flag antibody to detect the EBNA3 proteins or an anti-Myc or anti-GFP polyclonal antibody to detect the cellular putative partner protein.

GeneID	hits	Gene symbol	Full name	2YH	CoIP
3516	475	<i>RBPJ*</i>	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J	A B C	ND
1487	25	<i>CTBP1*</i>	C-Terminal binding protein 1	A C C _{Ct}	ND
3337	6	<i>DNAJB1*</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	A	A B C
7791	11	<i>ZYX*</i>	zyxin	B B _{Ct}	A B
55835	6	<i>CENPJ*</i>	Centromere protein J	B B _{Ct} C	A C
8665	1	<i>EIF3F*</i>	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	C	A B C
10987	4	<i>COPS5</i>	COP9 constitutive photomorphogenic homolog, subunit 5	A _{Nt} C _{Nt}	A B C
23557	3	<i>SNAPIN</i>	SNAP-associated protein	A _{Nt} C _{Nt}	A B C
7709	6	<i>ZBTB17</i>	zinc finger and BTB domain containing 17	B C _{Ct}	A B C
1488	2	<i>CTBP2</i>	C-Terminal binding protein 2	A	A B C
5536	2	<i>PPP5C</i>	protein phosphatase 5, catalytic subunit	A	A B C
4802	2	<i>NF-YC</i>	nuclear transcription factor Y, gamma	A	A B
409	1	<i>ARRB2</i>	arrestin, beta 2	A	A B C
4222	1	<i>MEOX1</i>	mesenchyme homeobox 1	A	A B C
79090	1	<i>TRAPPC6A</i>	trafficking protein particle complex 6A	A	A B C
10963	1	<i>STIP1</i>	Hsc70/Hsp90-organizing protein	A	A B C
3843	1	<i>IPO5</i>	Importin 5	A _{Nt}	A B C
6138	1	<i>RPL15</i>	ribosomal protein L15	A	A B C
151887	4	<i>CCDC80</i>	coiled-coil domain containing 80	C C _{Ct}	A B C
6136	1	<i>RPL12</i>	ribosomal protein L12	C	A B C
84893	5	<i>FBXO18</i>	F-box protein, helicase, 18	C C _{Nt}	A C
6613	3	<i>SUMO2</i>	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 2	C _{Ct}	A B C
10445	1	<i>MCRS1</i>	microspherule protein 1	C _{Ct}	A B C
9260	1	<i>PDLIM7</i>	PDZ and LIM domain 7	C _{Ct}	A B C

Table 1. List of cellular proteins interacting with EBNA-3A/-3B/-3C identified in the Y2H screens and validated *in cellulo* by co-immunoprecipitations in HEK293T cells. Each human gene is identified by its National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene ID (first column), gene symbol (third column) and full name (fourth column). The number of hits indicated (second column) is given without discrimination of the bait protein. Column 5 indicates with which bait protein(s) the cellular partner has been identified. Column 5 indicates which of the EBNA-3A/-3B/-3C have been found to interact with the cellular partner by co-immunoprecipitation *in cellulo*. A: EBNA-3A, B: EBNA-3B, C: EBNA-3C, A_{Nt}: EBNA-3A (1-310), B_{Ct}: EBNA-3B (1-325), C_{Nt}: EBNA-3C (1-320), C_{Ct}: EBNA-3C (279-938). ND: Not Done. * Indicates cellular partners for which an interaction with at least one of the EBNA3s has previously been described.

Figure 1

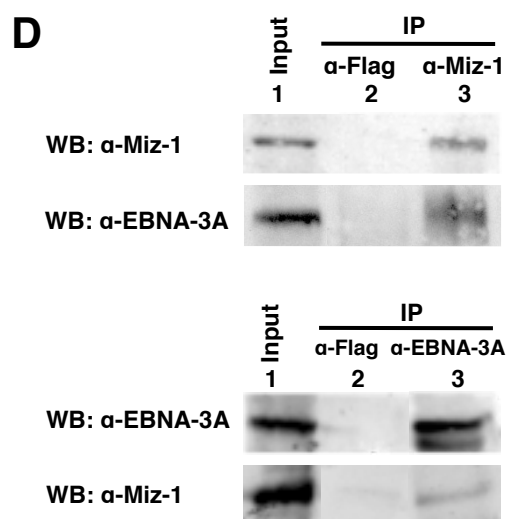
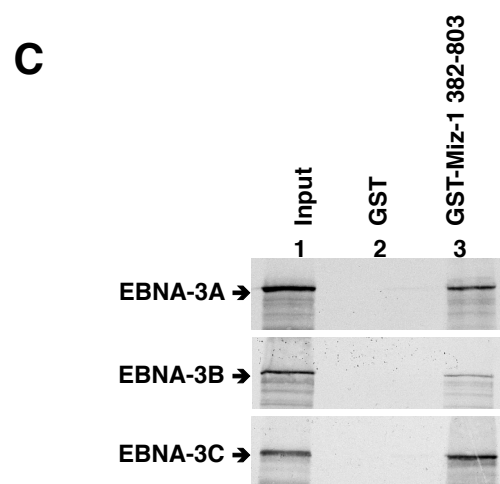
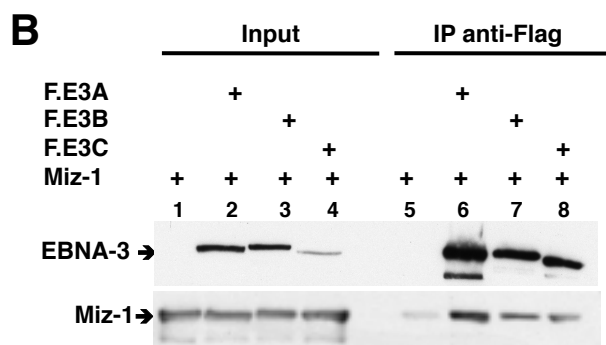
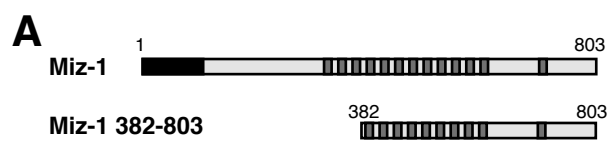


Figure 2

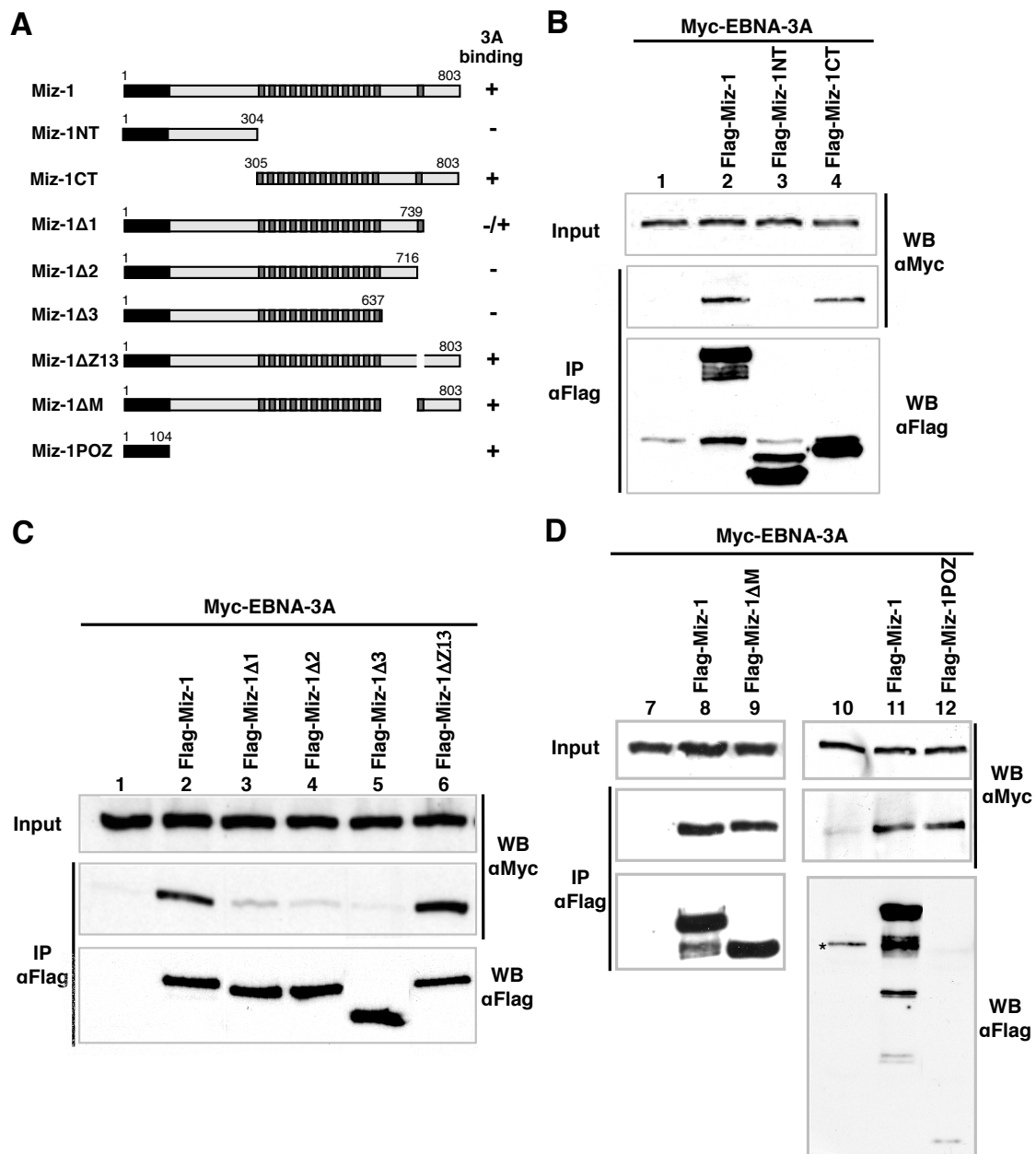
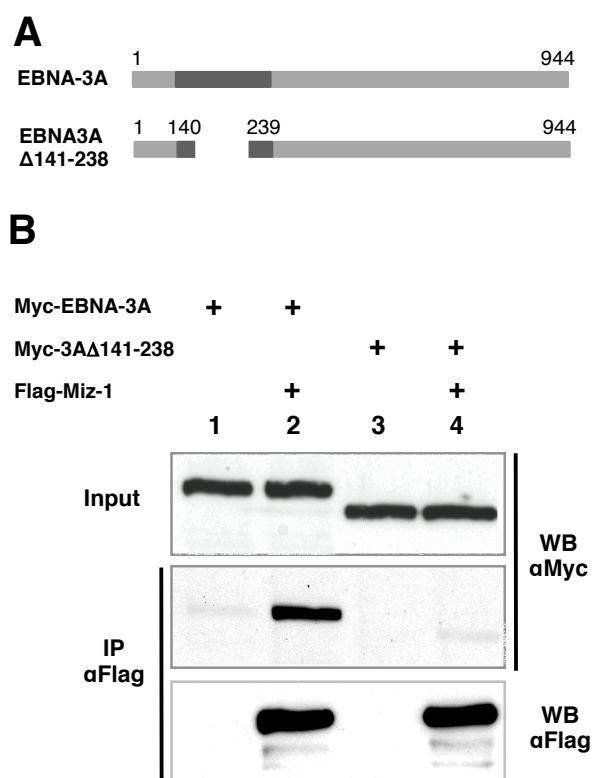


Figure 3



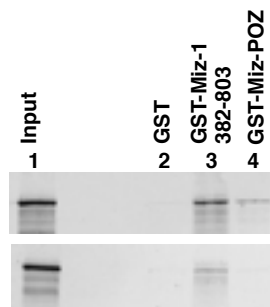
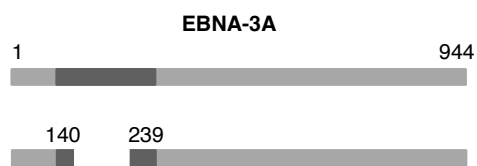
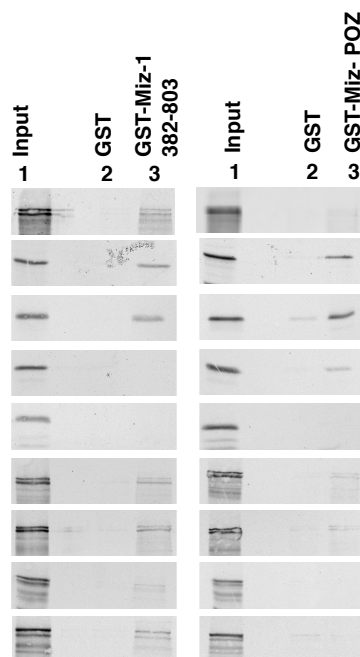
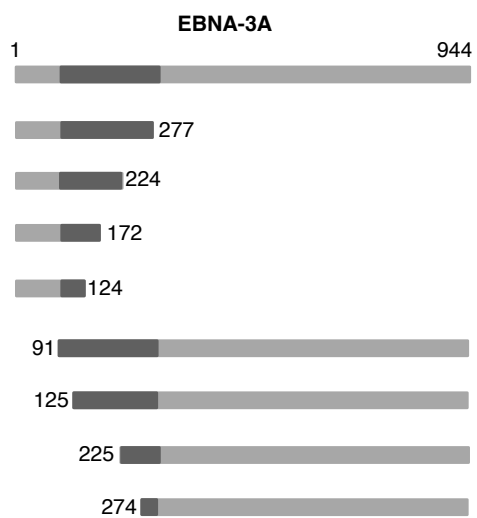
A**B****Figure 4**

Figure 5

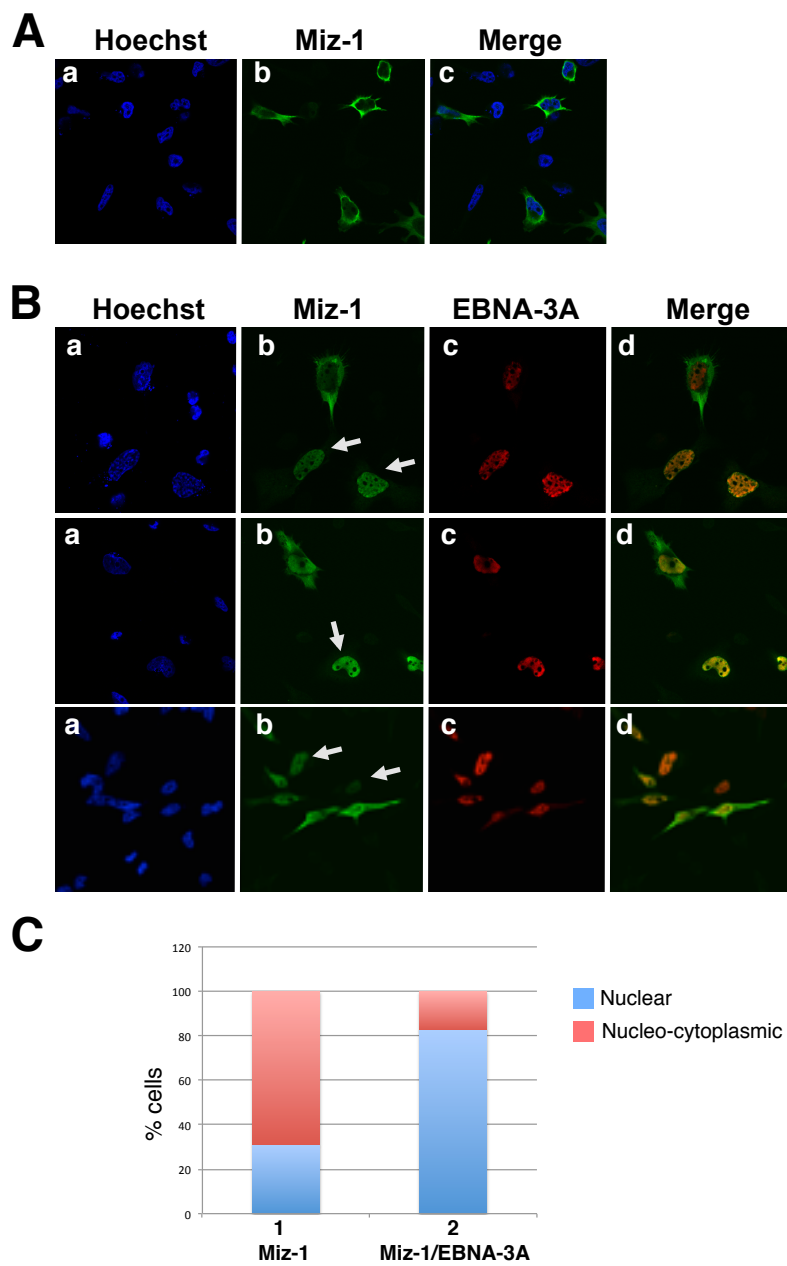


Figure 6

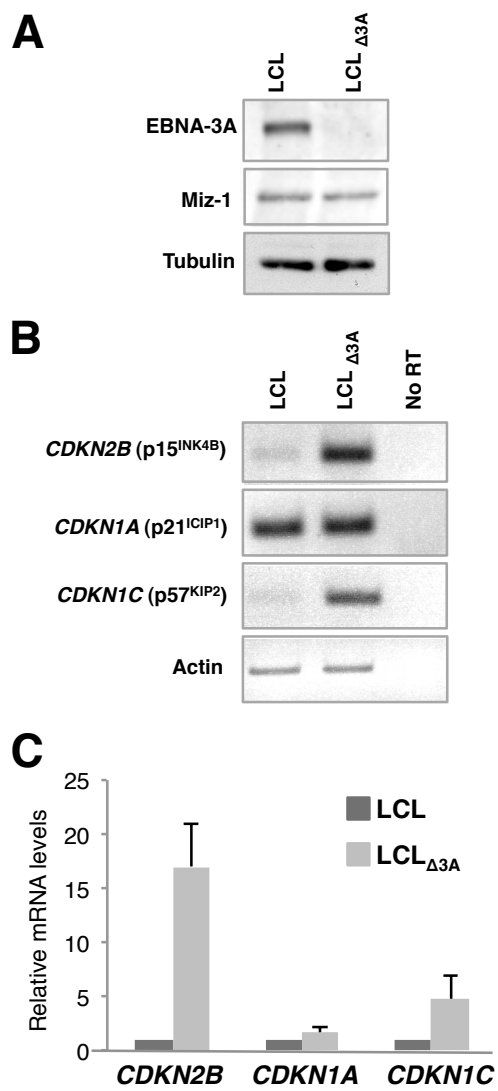


Figure 7

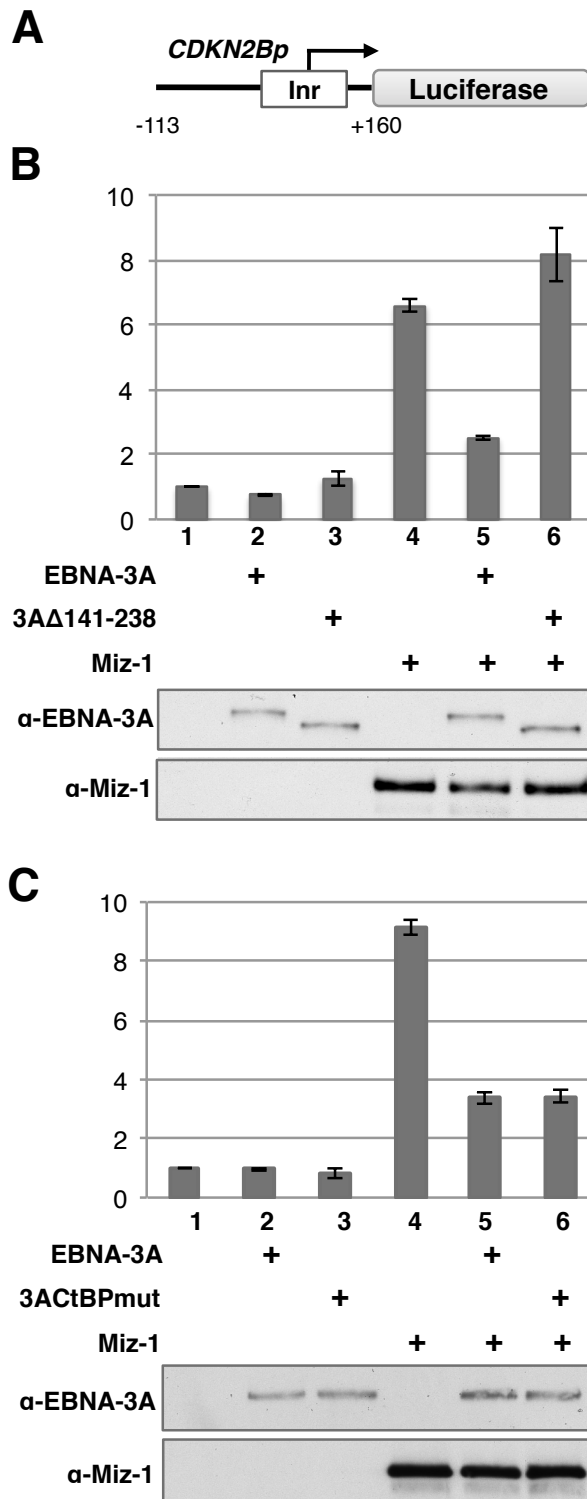


Figure 8

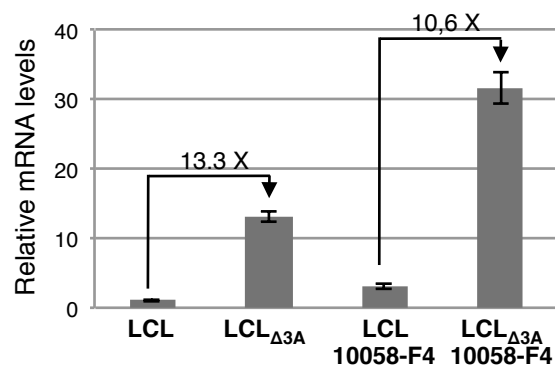
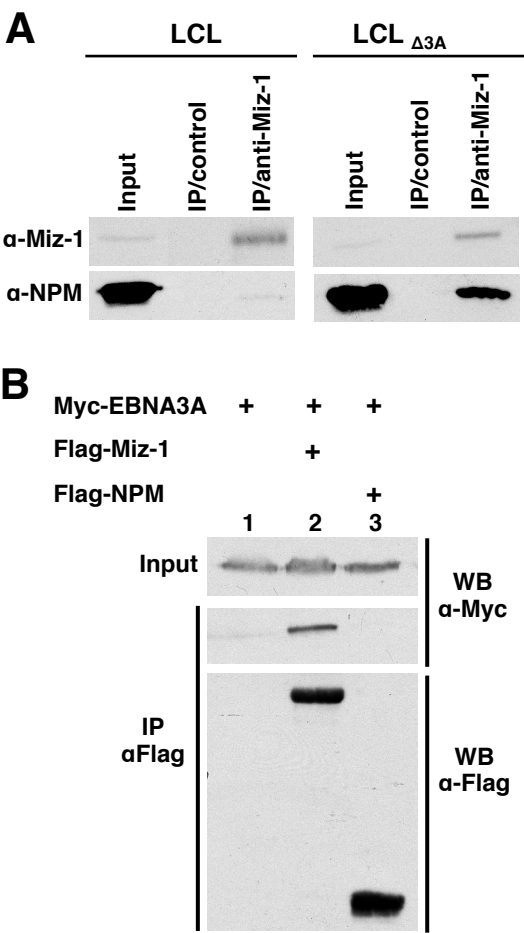
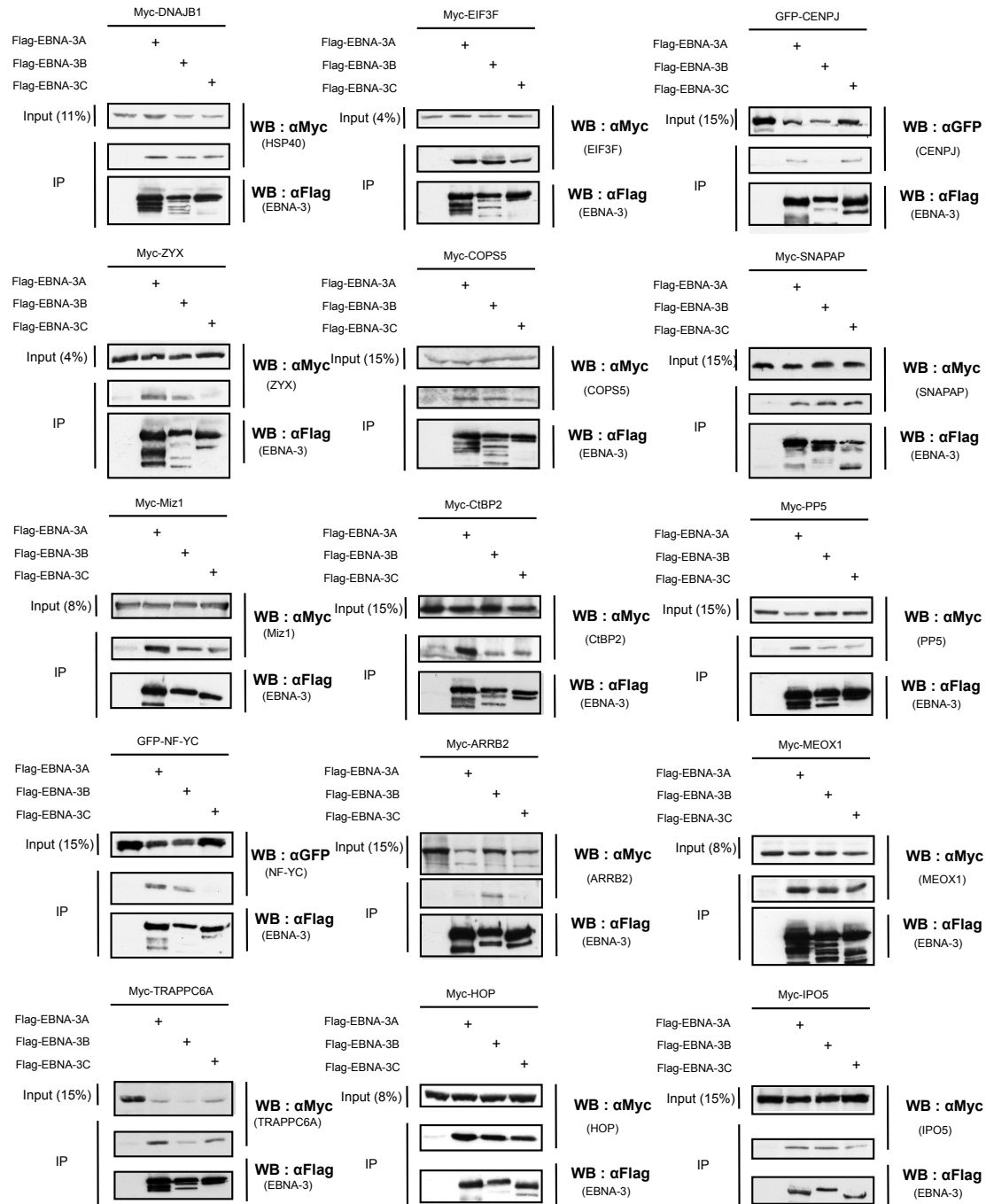


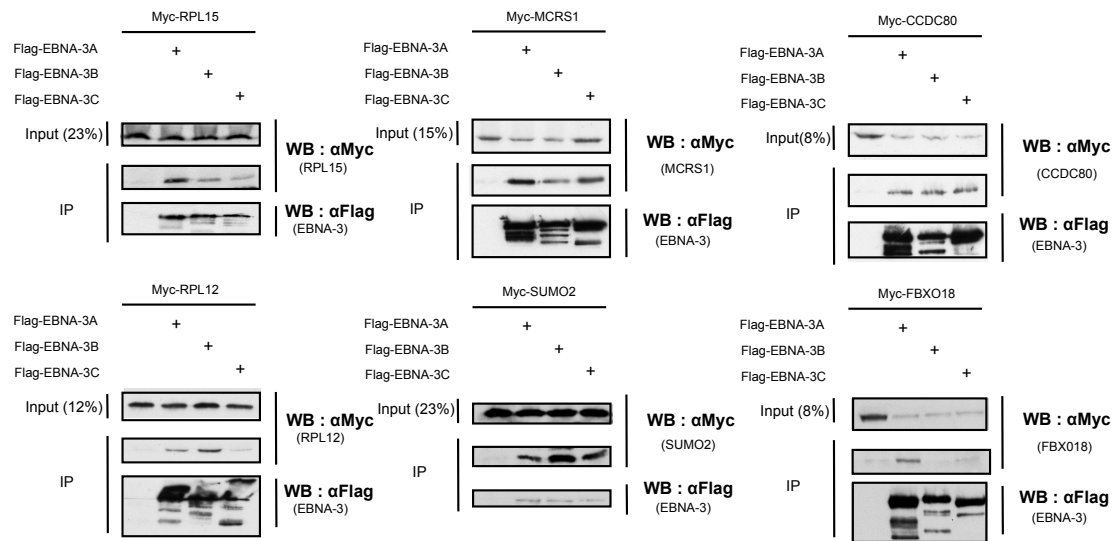
Figure 9



Supplementary Data Figure 1 (1/2)



Supplementary Data Figure 1 (1/2)



Supplémentary Data Table 1

Primer name	Primer sequence
β-actin forward (Human)	GCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAG
β-actin reverse (Human)	ATCTCATTTGTGCTGGGTGCCAG
GAPDH forward (Human)	TCCACCACCCTGTTGCTGTAG
GAPDH reverse (Human)	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC
p15 RNA forward	CGGAGTCAACCGTTTCGG
p15 RNA reverse	GGTGAGAGTGGCAGGGTCTG
P21 RNA forward	TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA
p21 RNA reverse	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAATC
p57 RNA forward	ATGTCCGACGCGTCCCTCC
p57 RNA reverse	CGAGTCGCTGTCCACTTCGG

III. La région d'homologie des EBNA3: une plateforme d'interaction avec de nombreux partenaires cellulaires

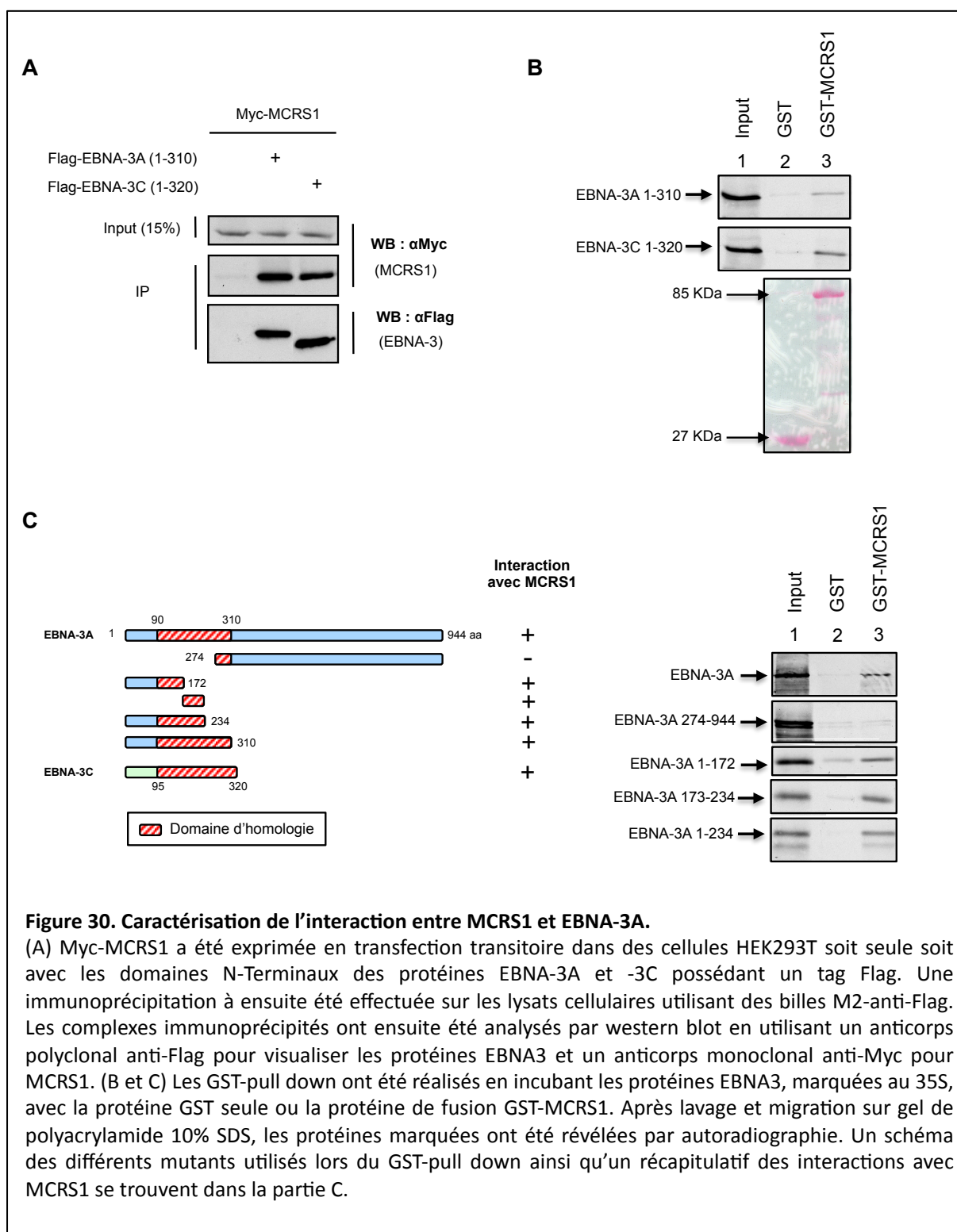
La plupart des partenaires identifiés lors de nos cribles deux-hybrides interagissant avec une des protéines EBNA3, interagissent aussi avec les deux autres protéines de la famille EBNA3. Ceci laisse penser que les protéines cellulaires en question interagissent avec le domaine N-Terminal des EBNA3, région connue pour être homologue entre les trois protéines de la famille. Par ailleurs, la plupart des partenaires déjà identifiés pour la protéine EBNA-3C (protéine la plus étudiée de la famille EBNA3) interagissent au même endroit dans le domaine N-Terminal, au niveau de la région d'homologie.

Nous avons donc voulu vérifier si les partenaires identifiés dans nos cribles deux-hybrides interagissent eux aussi avec le domaine N-Terminal des EBNA3 en caractérisant le domaine d'interaction de trois partenaires cellulaires avec la protéine EBNA-3A. Pour cela nous avons choisi d'utiliser la technique du GST-pull down *in vitro*. Enfin, nous avons aussi étudié le rôle de ce domaine d'homologie dans l'interaction entre les protéines EBNA-3A et EBNA-3C, qui avaient préalablement été montrées comme interagissant ensemble (Calderwood et al., 2007).

III. 1. Caractérisation de l'interaction entre MCRS1 et EBNA-3A

La protéine MCRS1 est un partenaire cellulaire identifié en crible deux-hybrides avec EBNA-3C, puis validé pour son interaction avec les trois protéines EBNA3. Cette protéine cellulaire est tout particulièrement intéressante car il a été montré qu'elle possède des propriétés de suppresseur de tumeur. Même si les fonctions exactes de cette protéine ne sont pas encore élucidées, il est connue que MCRS1 joue un rôle dans la transcription, notamment dans l'activation des gènes ribosomiques (Shimono et al., 2005).

Nous avons pu montrer par des expériences de co-immunoprécipitation en cellules HEK293T ainsi que par GST-pull down *in vitro*, que la protéine MCRS1 interagit bien avec le domaine N-Terminal des protéines EBNA-3A et -3C (**Fig 30A et 30B**).



Afin de localiser plus précisément la région d'interaction nous avons effectué des GST-pull down *in vitro* en utilisant différents mutants de la protéine EBNA-3A (**Fig 30C**). Alors que la protéine EBNA-3A traduite *in vitro* interagit avec la protéine de fusion GST-MCRS1, le mutant d'EBNA-3A dépourvu de sa région N-Terminale n'est plus capable d'interagir avec MCRS1. Ce résultat indique que MCRS1 interagit bel et bien au niveau du

domaine N-Terminal d'EBNA-3A. Le mutant d'EBNA-3A 1-172 interagit avec la protéine GST-MCRS1, mais cette interaction est assez faible comparée au contrôle avec la protéine GST seule. De manière intéressante, un mutant d'EBNA-3A exprimant la région comprise entre les acides aminés 173 et 234 interagit parfaitement avec GST-MCRS1. De la même manière, le mutant 1-234 d'EBNA-3A est capable d'interagir avec GST-MCRS1.

La protéine MCRS1 est donc capable d'interagir avec EBNA-3A au niveau de la région située entre les acides aminés 173 et 234. Cette région d'interaction se situe dans le domaine N-Terminal d'EBNA-3A, au niveau de la région d'homologie entre les trois protéines EBNA3, expliquant ainsi pourquoi ce partenaire cellulaire est commun aux trois protéines virales.

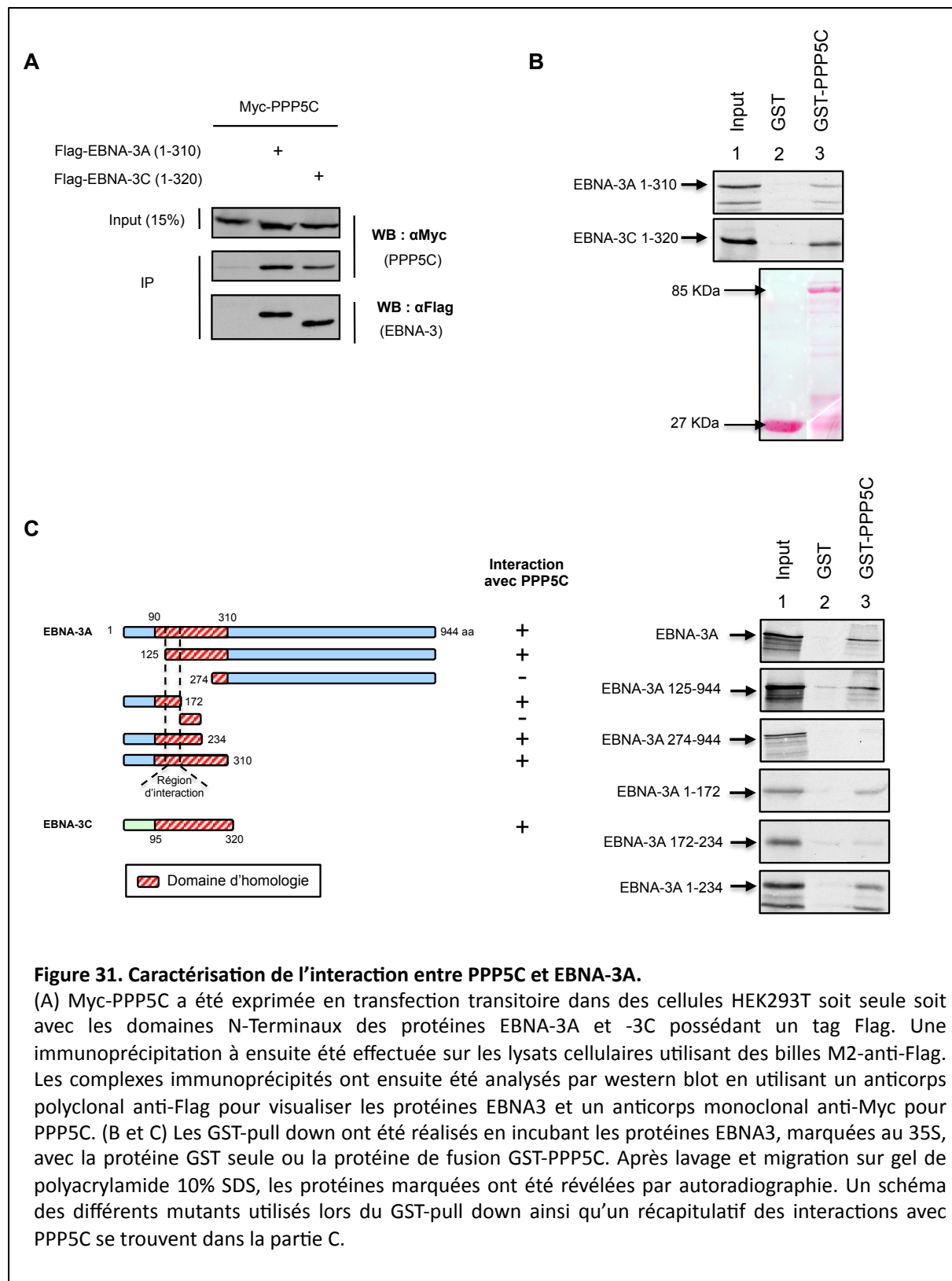
III. 2. Caractérisation de l'interaction entre PPP5C et EBNA-3A

Lors de nos cribles deux-hybrides, la protéine phosphatase 5 (PPP5C) a été identifiée comme un partenaire potentiel de la protéine EBNA-3A. Cet interactant a par la suite été validé pour les trois protéines EBNA3. PPP5C est une protéine intéressante, car cette dernière est connue pour son rôle d'activateur des kinases ATM et ATR en réponse aux dommages à l'ADN. Or, il a déjà été montré que les EBNA3 sont capables d'inhiber la voie ATM/ATR activée après traitement des cellules par des drogues cytotoxiques (HU, ABHA, Etoposide). Cette inhibition permet aux cellules de passer outre le point de contrôle de la phase G2/M (voir introduction §III. 2. 1. 3.). La protéine PPP5C pourrait alors jouer un rôle dans l'inhibition de la voie ATM/ATR par les protéines EBNA3.

L'interaction entre PPP5C et les domaines N-Terminaux des protéines EBNA-3A et -3C a été testée en co-immunoprécipitation en cellule HEK293T ainsi qu'en GST-pull down *in vitro* (**Fig 31A** et **31B**). Tout comme MCRS1, la protéine PPP5C interagit avec le domaine N-Terminal d'EBNA-3A et d'EBNA-3C.

Nous avons ensuite voulu déterminer la région exacte d'interaction dans le domaine N-Terminal d'EBNA-3A (toujours par GST-pull down *in vitro*) (**Fig 31C**). Alors que la protéine EBNA-3A entière et le mutant 125-944 d'EBNA-3A interagissent avec la protéine de fusion GST-PPP5C, le mutant 274-944 n'est plus capable d'interagir avec PPP5C. Ceci indique que le domaine d'interaction de PPP5C se situe entre les acides aminés 125 et 274. Le

mutant 1-234 d'EBNA-3A est toujours capable d'interagir avec GST-PPP5C, permettant de ramener la zone d'interaction à une région localisée entre les acides aminés 125 à 234. Enfin, le mutant 1-172 d'EBNA-3A est toujours capable d'interagir avec GST-PPP5C alors que le mutant 173-234 n'est quant à lui plus capable.



La région d'interaction de PPP5C est comprise entre les acides aminés 125 et 172 d'EBNA-3A. Cette région se situe donc au niveau de la région d'homologie entre les trois protéines EBNA3 mais est différente de la région impliquée dans l'interaction avec MCRS1.

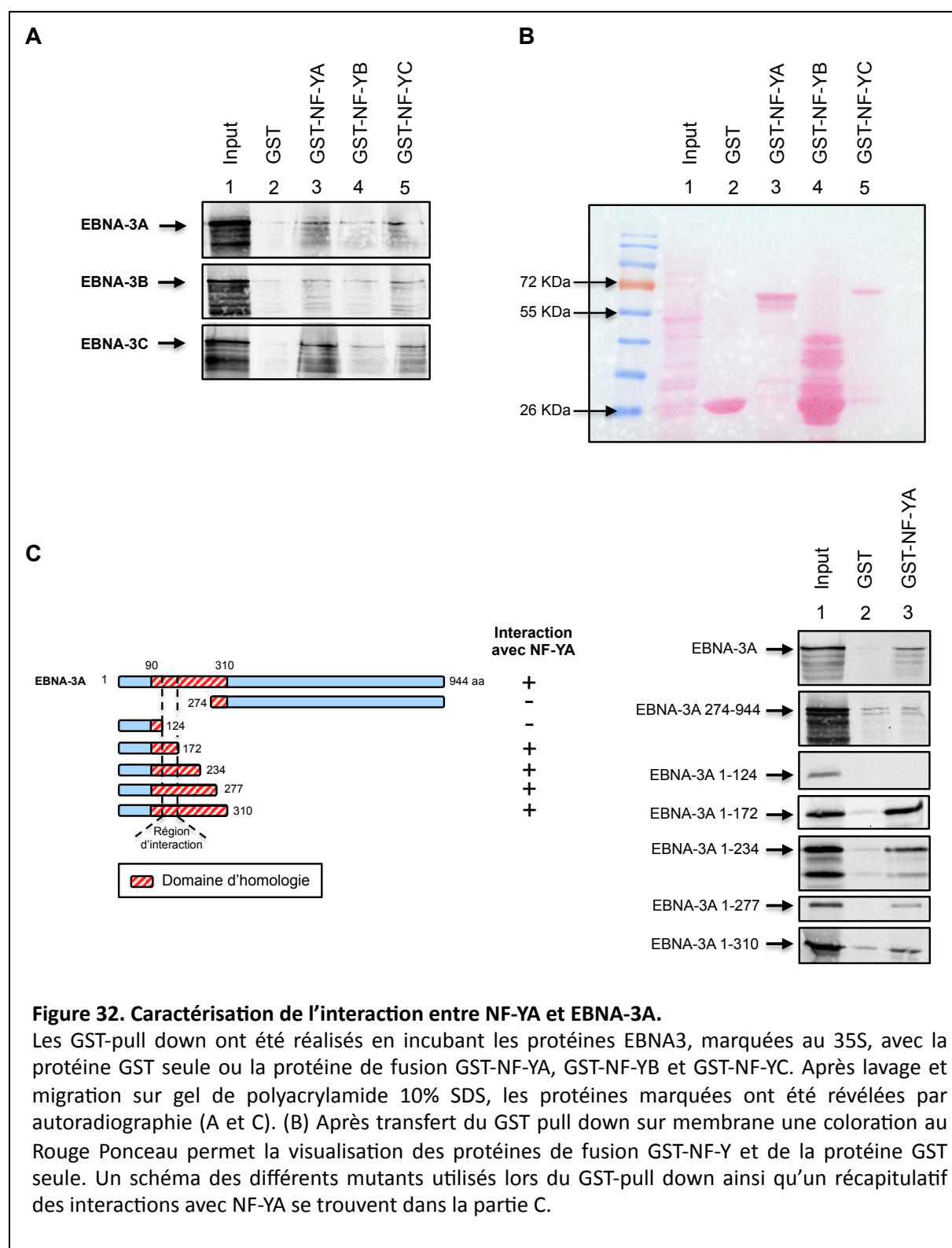
III. 3. Caractérisation de l'interaction entre NF-YA et EBNA-3A

Le facteur de transcription NF-Y (via sa sous-unité NF-YC) a été identifié comme nouveau partenaire de la protéine EBNA-3A grâce à nos cribles deux-hybrides. NF-Y est un facteur de transcription composé des trois sous unités (NF-YA, NF-YB et NF-YC), liant les séquence CCAAT et contrôlant l'expression nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. En co-immunoprécipitation en cellules HEK293T nous avons déjà montré que les sous-unités NF-YA et NF-YC interagissent avec EBNA-3A et EBNA-3B, mais pas avec EBNA-3C (Voir §I. 2. 2. 2.), alors que la sous unité NF-YB interagit avec les trois protéines EBNA3. Il semble donc, *in vivo*, y avoir une différence d'affinité entre les différentes sous-unités du facteur NF-Y et les protéines EBNA3.

Nous avons ensuite testé l'interaction des trois protéines EBNA3 avec les trois sous-unités du facteur NF-Y en GST-pull down *in vitro* (**Fig 32A**). Contrairement aux résultats *in vivo*, les trois protéines EBNA3 interagissent *in vitro* avec chacune des sous-unités du facteur de transcription NF-Y. La protéine EBNA-3C, qui en co-immunoprécipitation en cellules HEK293T n'interagit pas avec NF-YA et NF-YC, interagit *in vitro* par GST-pull down avec ces deux sous-unités. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vivo* des modifications post-traductionnelles (non présentes sur les protéines produites *in vitro* qui sont utilisées dans le GST-pull down) peuvent inhiber l'interaction entre EBNA-3C et ces deux-sous unités NF-Y.

Ces résultats de GST-pull down sont intéressants, cependant il est important de noter que l'on ne peut pas comparer l'affinité d'interaction entre les différentes sous unités car ces dernières ne sont pas exprimées de la même manière (**Fig 32B**). La protéine de fusion GST-NF-YA s'exprime très bien en bactérie et est attendue à 64 KDa, ce qui est effectivement observée (**Fig 32B**, ligne 3). La protéine GST-NF-YC est attendue à 67 KDa, ce qui est effectivement le cas mais est moins bien exprimée que GST-NF-YA (**Fig 32B**, ligne 5). Enfin, la protéine GST-NF-YB semble dégradée en bactérie. En effet, alors que cette dernière est attendue à 59KDa, nous n'observons qu'un smear à partir de 43 KDa (**Fig 32B**, ligne 4).

Cependant, les produits de dégradation de la protéine NF-YB semblent suffisants pour permettre l'interaction avec les protéines EBNA3.



Pour la suite de notre étude nous avons donc utilisé la protéine de fusion GST-NF-YA (qui se produisait le plus efficacement en bactérie) pour déterminer la région d'interaction de NF-YA dans la protéine EBNA-3A (**Fig 32 C**). Alors que la protéine EBNA-3A entière interagit efficacement avec la protéine de fusion NF-YA, le mutant 274-944 n'exprimant plus le domaine N-Terminal d'EBNA-3A perd l'interaction avec NF-YA. Ceci montre que la sous unité NF-YA interagit elle aussi avec la région N-Terminale d'EBNA-3A. L'utilisation de mutants du domaine N-Terminal d'EBNA-3A nous a ensuite permis de délimiter la zone minimale d'interaction de NF-YA entre les acides aminés 125 à 172.

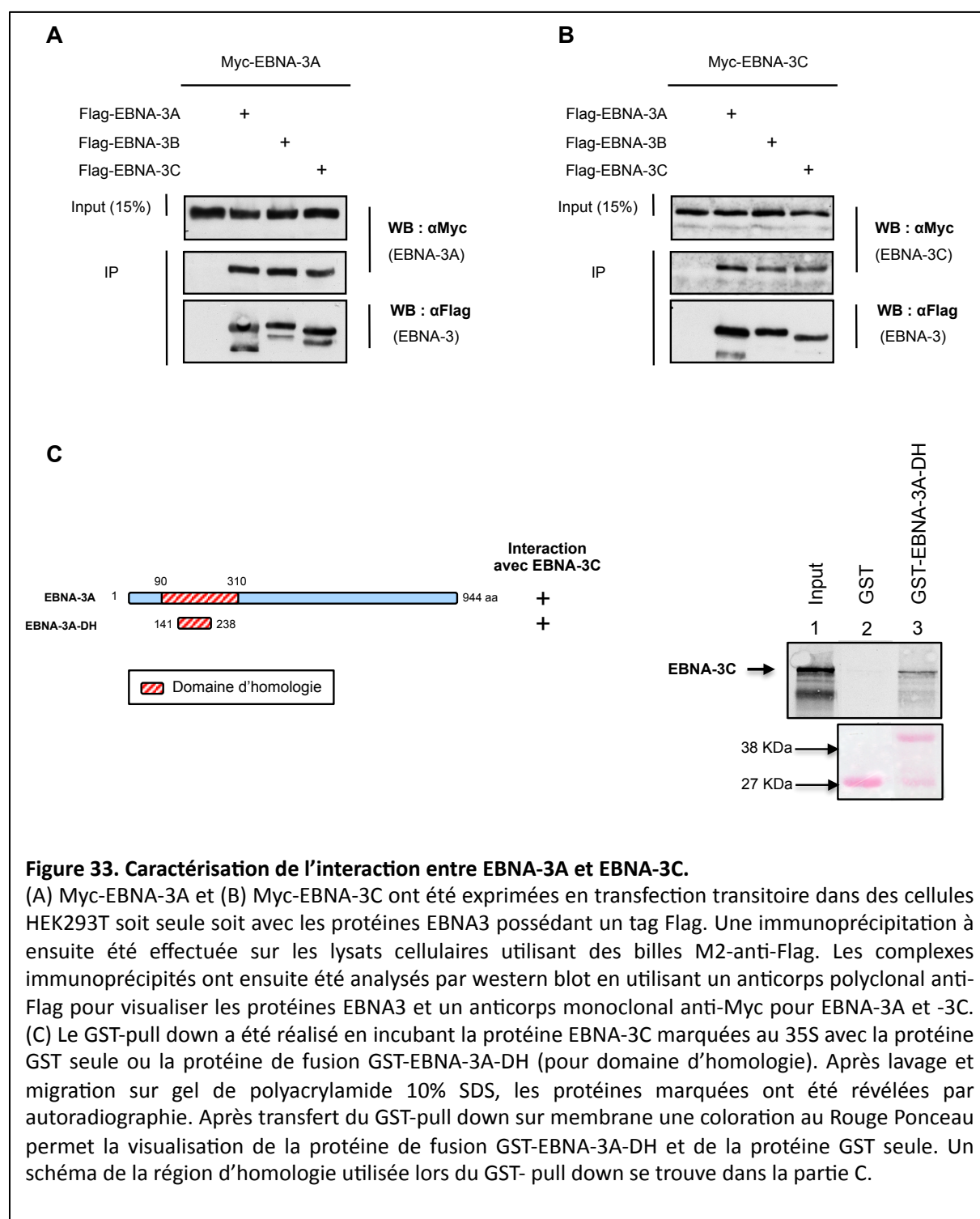
La sous-unité NF-YA du facteur NF-Y interagit donc au niveau de la région située entre les acides aminés 125 et 172 d'EBNA-3A. Cette région est aussi impliquée dans l'interaction d'EBNA-3A avec la protéine cellulaire PPP5C et se situe au niveau de la région d'homologie entre les protéines EBNA3.

III. 4. Caractérisation de l'interaction entre EBNA-3A et EBNA-3C

En 2007, Calderwood et ses collaborateurs ont réalisé un crible deux-hybrides entre toutes les protéines d'EBV et ont ainsi pu identifier une interaction potentielle entre la protéine EBNA-3A et EBNA-3C d'une part et qu'EBNA-3A était capable d'interagir avec elle même d'autre part (Calderwood et al., 2007). Récemment, l'interaction entre EBNA-3A et EBNA-3C a été confirmée en co-immunoprécipitation *in vivo* dans des cellules de lymphome de Burkitt infectées par EBV (Paschos et al., 2012). Cette interaction est très intéressante car elle permet de mieux comprendre comment les protéines EBNA-3A et -3C peuvent coopérer dans la régulation de l'expression de certains gènes cellulaires.

Afin de vérifier si EBNA-3A est capable d'interagir avec elle-même et avec les autres protéines de la famille EBNA3, nous avons réalisé une co-immunoprécipitation dans des cellules HEK293T transfectées transitoirement (**Fig 33A**). Comme attendu, la protéine EBNA-3A est capable d'interagir avec EBNA-3C. De plus, grâce à cette co-immunoprécipitation, nous avons validé l'interaction d'EBNA-3A avec elle même, interaction identifiée dans l'étude de Calderwood et al. Enfin, la protéine EBNA-3A est aussi capable d'interagir avec EBNA-3B. Nous avons pu aussi montrer, par co-

immunoprécipitation *in vivo*, que la protéine EBNA-3C est non seulement capable d'interagir avec EBNA-3A, mais aussi avec EBNA-3B et elle même (**Fig 33B**).



Le domaine d'homologie entre les trois protéines EBNA3 étant important pour l'interaction de ces dernières avec de nombreuses protéines cellulaires, nous avons alors voulu vérifier si cette région était impliquée dans l'interaction entre les deux protéines virales

EBNA-3A et -3C. Ainsi, nous avons montré que la protéine EBNA-3C interagit avec la protéine de fusion GST-EBNA-3A-DH (domaine d'homologie) (**Fig 33C**). La région d'homologie de la protéine EBNA-3A est donc aussi impliquée dans l'interaction avec la protéine EBNA-3C.

III. 5. Conclusions et perspectives

Les trois protéines de la famille EBNA3 possèdent un grand nombre de partenaires cellulaires en commun décrit dans la littérature dont la grande majorité interagit avec le domaine N-Terminal des EBNA3 au niveau de leur région d'homologie. Grâce à nos différents cribles deux-hybrides, nous avons identifié un grand nombre de protéines cellulaires interagissant avec les trois protéines virales, laissant supposer que ces partenaires interagissent eux aussi avec la région d'homologie des EBNA3.

Nous avons testé cette hypothèse pour trois partenaires cellulaires : MCRS1, PPP5C, et NF-YA. Ces trois protéines interagissent avec le domaine N-Terminal d'EBNA-3A au niveau de la région d'homologie des EBNA3, cependant, les régions impliquées ne sont pas les mêmes. En effet, la région localisée entre les acides aminés 172 à 234 d'EBNA-3A permet l'interaction avec MCRS1 mais n'interagit pas avec la protéine PPP5C. La région permettant l'interaction avec PPP5C et NF-YA est située entre les acides aminés 1 à 172 d'EBNA-3A. Cette région interagit elle aussi avec MCRS1 ce qui suggère que MCRS1 interagit avec deux régions différentes d'EBNA-3A, une première localisée entre les acides aminés 1 à 172, et une deuxième entre les acides aminés 172 à 234. Différents sous domaines de cette région d'homologie permettent donc une interaction avec des protéines spécifiques. Nous retrouvons ce cas de figure pour l'interaction d'EBNA-3A avec le facteur de transcription Miz-1 pour lequel la région localisée entre les acides aminés 1 à 172 interagit avec son domaine POZ mais n'est pas suffisante pour l'interaction avec sa partie C-Terminale.

Le fait que la région d'homologie des EBNA3 soit une plateforme d'interaction pour de multiples partenaires cellulaires est intéressant mais pose un problème lors de la réalisation des études sur les rôles fonctionnels de ces interactions. En effet, l'utilisation d'un mutant des EBNA3 inhibant l'interaction avec un partenaire spécifique a de grande chance d'affecter l'interaction avec d'autres partenaires cellulaires, pouvant ainsi fausser les résultats.

Nous avons aussi montré que la protéine EBNA-3A est capable d'interagir avec EBNA-3B, -3C, et elle même. L'interaction d'EBNA-3A avec EBNA-3C passe aussi par la région d'homologie entre les EBNA3. Le fait que les protéines EBNA3 interagissent entre elles permet de mieux comprendre comment les EBNA3 coopèrent pour la régulation de certains gènes cellulaires. Dans plusieurs études s'intéressant à un gène cible particulier des EBNA3, l'inhibition de la protéine EBNA-3A ou de la protéine EBNA-3C inhibe totalement l'effet des EBNA3. C'est le cas notamment des études sur la répression du gène *bim* par EBNA-3A et -3C pour lequel l'inhibition de l'une ou l'autre de ces deux protéines virales annule complètement l'inhibition de l'expression du gène *bim*. Même si les protéines EBNA-3A et EBNA-3C doivent dans certains cas agir seules, dans d'autres elles doivent donc agir sous forme d'hétérodimères. Cela pourrait par exemple expliquer le fait que dans notre étude avec le facteur de transcription Miz-1, les lignées de LCL dépourvues d'EBNA-3A expriment si fortement le gène *CDKN2B* alors que l'on sait que EBNA-3C et même EBNA-3B interagissent aussi avec Miz-1.

L'ensemble de ces résultats montre que cette région d'homologie est très importante pour l'interaction des EBNA3 avec leurs partenaires cellulaires et viraux.

Chapitre III : Conclusion générale

Les protéines de la famille EBNA3 (EBNA-3A, -3B, -3C) sont produites par des gènes contigus dans le génome viral et apparentés. Les EBNA3 ont d'abord été caractérisés comme des régulateurs transcriptionnels qui ne se fixent pas directement l'ADN et sont aussi impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire en interagissant directement avec plusieurs régulateurs majeurs du cycle cellulaire (pRB, cyclines A et D1) et en régulant leur dégradation par le protéasome. Les EBNA3 ont donc de multiples fonctions qui convergent toutes vers une stimulation de la prolifération cellulaire et une survie accrue des cellules en condition de stress ou suite à des dommages à l'ADN. Malgré l'abondance de données dans la littérature, essentiellement sur EBNA-3C, les fonctions exactes des EBNA3 sont encore loin d'être comprises. Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des protéines EBNA3 sur le dérèglement du cycle cellulaire, je me suis intéressé au cours de ma thèse à leurs partenaires cellulaires. Ainsi, par crible deux-hybrides en levure, nous avons mis en évidence de nombreux nouveaux partenaires pour chacune des protéines EBNA3. Puis, nous avons étudié d'un point de vue fonctionnel l'interaction entre la protéine virale EBNA-3A et le facteur de transcription Miz-1.

Les différents cribles deux-hybrides effectués nous ont permis de mettre en évidence un grand nombre de partenaires potentiels pour les protéines virales EBNA3 dont six étaient déjà connues dans la littérature. Nous avons ensuite re-testé ces partenaires cellulaires pour leur interaction avec les protéines EBNA3 par co-immunoprécipitation en cellules HEK293T et nous avons pu valider 18 protéines cellulaires comme nouveaux interactants des EBNA3. Cependant, parmi tous les interactants identifiés lors de nos cribles deux-hybrides, dix n'ont pour le moment pas encore pu être re-testés dans le système de co-immunoprécipitation en cellules HEK293T. Il serait donc intéressant de compléter les validations afin de finaliser les résultats de nos cribles deux-hybrides. Ces nouveaux partenaires sont particulièrement pertinents et intéressants au vu de ce que l'on connaît des fonctions des protéines EBNA3 et offrent de nouvelles perspectives d'études pour la fonction de ces protéines virales dans l'immortalisation des cellules B par le virus d'Epstein-Barr.

Parmi ces nouveaux partenaires, le facteur de transcription Miz-1 (Myc-interacting zinc finger protein 1) a tout particulièrement attiré notre attention. Miz-1 est connu pour jouer un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire en transactivant des gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire dont les gènes *CDKN1A* (codant pour p21^{CIP1}), *CDKN1C* (codant pour p27^{KIP2}) et *CDKN2B* (codant pour p15^{INK4B}) (Staller et al., 2001; Wu et al., 2003). Nous avons

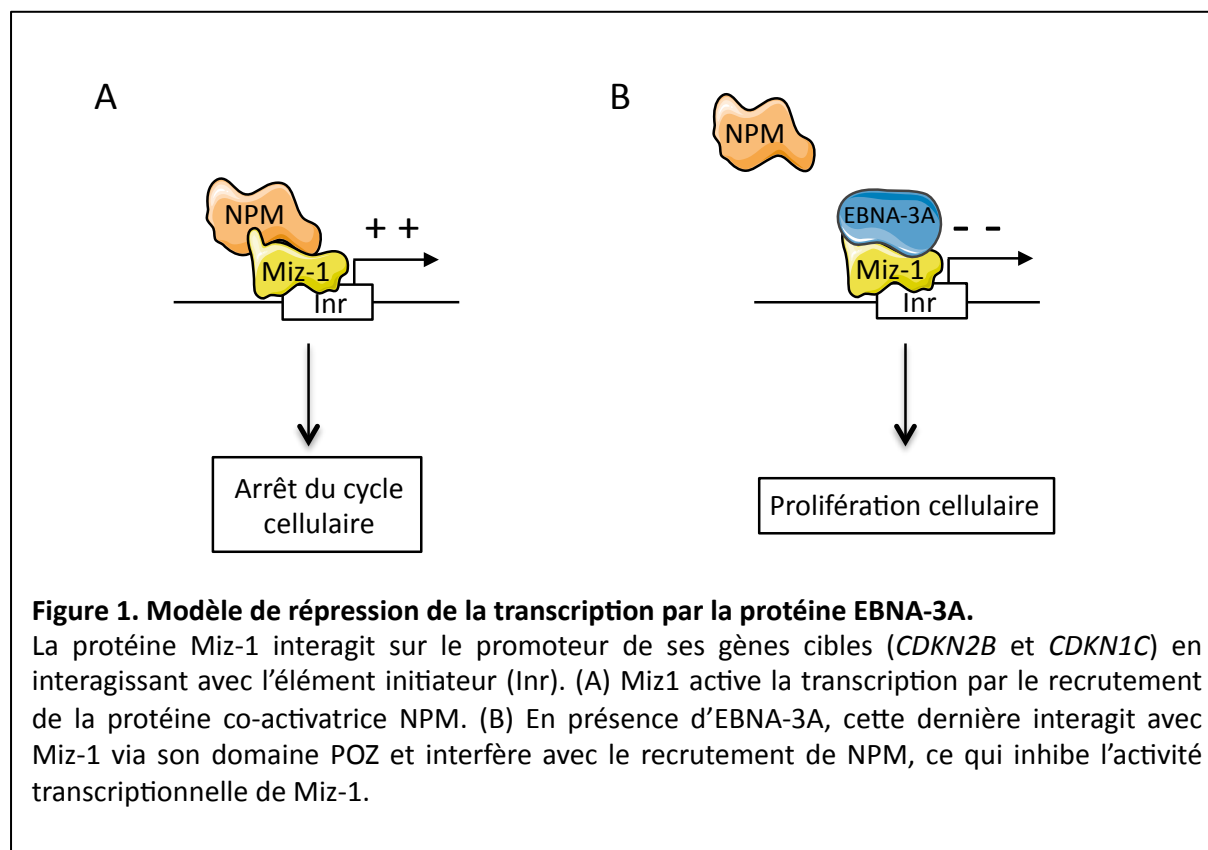
dans un premier temps validé l'interaction de ce partenaire avec les trois protéines de la famille EBNA3 puis nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'interaction entre EBNA-3A et Miz-1. Par des expériences de GST-pull down *in vitro* ainsi que de co-immunoprécipitations en cellules HeLa nous avons montré qu'EBNA-3A interagit avec deux régions différentes de Miz-1 : le domaine POZ (en N-Terminal) et la région C-Terminale (entre les acides aminés 739 et 803). Nous nous sommes ensuite intéressés à la région de la protéine EBNA-3A impliquée dans l'interaction avec Miz-1. Les trois protéines EBNA3 interagissant avec Miz-1, nous avons supposé que la région d'interaction était localisée dans le domaine d'homologie des EBNA3. Nous avons donc testé cette hypothèse en utilisant un mutant de la protéine EBNA-3A dépourvue de la région comprise entre les acides aminés 141 et 238. La co-immunoprécipitation de ce mutant avec Miz-1 est fortement réduite par rapport à la protéine EBNA-3A sauvage, suggérant que le domaine principal d'interaction se situe dans la région d'homologie des EBNA3. Afin de confirmer et de préciser le ou les domaines d'interaction d'EBNA-3A avec Miz-1, nous avons effectué des expériences de GST-pull down en utilisant des protéines chimères GST-Miz-1 382-803 et GST-Miz-POZ ainsi que différents mutants de délétion d'EBNA-3A. Les résultats de ces expériences indiquent que la protéine EBNA-3A interagit avec le domaine POZ de Miz-1 via une région minimale comprise entre les acides aminés 125 et 172 et interagit également avec la partie C-Terminale de Miz-1 par plusieurs régions, une majoritaire localisée dans la partie N-Terminale d'EBNA-3A (contenant le domaine d'homologie des EBNA3) et une autre dans la partie C-Terminale de la protéine virale. Il serait intéressant maintenant de localiser plus précisément le domaine d'interaction d'EBNA-3A dans cette partie C-Terminale.

Une fois les différents domaines d'interaction entre EBNA-3A et Miz-1 identifiés, nous nous sommes intéressés à la co-localisation de ces deux protéines dans les cellules. Alors qu'EBNA-3A est strictement nucléaire, Miz-1 est une protéine nucléo-cytoplasmique. Nous avons montré, par des expériences d'immunofluorescence en cellules HeLa, qu'EBNA-3A relocalise la protéine Miz-1 du cytoplasme vers le noyau des cellules. Miz-1 étant principalement connue pour son effet transactivateur sur les gènes codant les inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes p21^{CIP1} (*CDKN1A*), p57^{KIP2} (*CDKN1C*) et p15^{INK4B} (*CDKN2B*), nous nous sommes intéressés à l'effet d'EBNA-3A sur ces gènes. Pour cela, nous avons comparé le niveau des transcrits de ces trois gènes cibles de Miz-1 entre une lignée de LCL sauvage et une lignée de LCL dépourvue de l'expression de la protéine EBNA-3A. De manière intéressante, la présence d'EBNA-3A est associée à une forte répression des gènes *CDKN2B* et *CDKN1C*. Concernant *CDKN1A*, nous avons observé une légère inhibition des

transcrits de ce gène en présence d'EBNA-3A. Cependant, Yenamandra et ses collègues ont récemment montré, en utilisant les mêmes lignées cellulaires, que le niveau d'expression du gène *CDKN1A* est plus de 8 fois réprimé en présence d'EBNA-3A, confortant ainsi le fait que la protéine EBNA-3A joue un rôle dans la régulation de ce gène (Yenamandra et al., 2010). L'expression du gène *CDKN1A* étant associé à l'arrêt du cycle cellulaire, ce dernier est finement régulé par de nombreux facteurs de transcription comme Sp1, KLF4, ou encore le plus connu p53 (Gartel et al., 2001; Rowland and Peeper, 2006; Riley et al., 2008). Il est donc possible que différentes conditions de cultures des cellules affectent le cycle cellulaire et donc le niveau d'expression de *CDKN1A*, expliquant ainsi la différence d'expression entre nos résultats et ceux de l'étude de Yenamandra et ses collaborateurs. Afin de démontrer que la régulation de ces gènes est due à l'interaction d'EBNA-3A avec Miz-1 nous avons étudié l'effet d'EBNA-3A sur l'activation de la transcription du promoteur *CDKN2B*. Pour cela, nous avons utilisé un plasmide rapporteur comprenant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur basal du gène *CDKN2B*. Nous avons montré que l'expression d'EBNA-3A réprime l'activation par Miz-1 alors qu'un mutant d'EBNA-3A défaillant pour son interaction avec Miz-1 n'a plus d'effet sur ce même promoteur *CDKN2B*.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans la répression de l'activité transcriptionnelle de Miz-1 par la protéine EBNA-3A. Nous avons montré que cette inhibition est indépendante de la présence de la protéine c-Myc et n'est pas due au recrutement par EBNA-3A du co-répresseur CtBP1. Il est connu que la protéine Miz-1 active la transcription grâce au recrutement de la protéine NPM via son domaine POZ, domaine que nous avons identifié comme interagissant avec EBNA-3A. Nous nous sommes alors intéressés à la capacité d'EBNA-3A à interférer avec le recrutement par Miz-1 de la protéine co-activatrice NPM et nous avons montré, par des expériences de co-immunoprécipitation en LCL, qu'EBNA-3A est capable d'inhiber l'interaction entre Miz-1 et NPM.

L'ensemble de cette étude nous permet de proposer un modèle d'action de la protéine EBNA-3A (**Fig 1**) : en absence d'EBNA-3A le facteur de transcription Miz-1 recrute la protéine co-activatrice NPM et active la transcription des gènes *CDKN2B* et *CDKN1C*. Cependant, lorsqu'EBNA-3A est exprimée, cette dernière interagit avec Miz-1 et interfère avec le recrutement de NPM, inhibant ainsi la transcription des gènes *CDKN2B* et *CDKN1C*, permettant la prolifération des cellules.



Le modèle que nous proposons suggère que la protéine EBNA-3A est recrutée sur le promoteur du gène *CDKN2B* et *CDKN1C* par le facteur de transcription Miz-1. Cependant, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse d'une déstabilisation de Miz-1 sur l'ADN en présence d'EBNA-3A. Il serait donc intéressant de réaliser des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) afin de vérifier si EBNA-3A est recrutée sur les gènes cibles de Miz-1 ou de vérifier si l'interaction du facteur de transcription Miz-1 avec l'ADN est déstabilisée en présence d'EBNA-3A. De plus, il serait intéressant d'étudier l'effet de la protéine EBNA-3A sur les autres gènes cibles de Miz-1, comme le gène codant pour la protéine anti-apoptotique BCL2. Enfin, puisque Miz-1 interagit avec les trois protéines virales EBNA3, il serait intéressant de regarder si EBNA-3B et EBNA-3C interagissent avec les mêmes domaines de Miz-1 qu'EBNA-3A (notamment au niveau du domaine POZ) et si ces deux protéines virales possèdent les mêmes capacités d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de Miz-1 qu'EBNA-3A.

Les résultats de nos cribles deux-hybrides nous ont permis de mettre en évidence que les trois protéines de la famille EBNA3 possèdent un grand nombre de partenaires cellulaires en communs, dont la grande majorité interagit avec le domaine N-Terminal des EBNA3 au

niveau de leur région d'homologie (comme la protéine PPP5C, MCRS1, NF-YC ou encore Miz-1). Nous avons aussi montré que l'interaction d'EBNA-3A avec EBNA-3C passe aussi par la région d'homologie entre les EBNA3. Cette région d'homologie entre les trois protéines EBNA3 semble donc être une plateforme d'interaction très importante pour de multiples partenaires cellulaires et viraux.

Les protéines EBNA3 ont tout d'abord été décrites pour leur capacité de régulateurs de la transcription, régulateurs atypiques car elles ne peuvent pas se fixer directement à l'ADN. L'effet des protéines EBNA3 passe donc par l'interaction avec des protéines qui, elles, lient l'ADN. Jusqu'à aujourd'hui, seule la protéine RBP-Jk avait été rapportée comme une protéine faisant le lien entre l'ADN et les protéines EBNA3. Notre étude sur les partenaires des protéines EBNA3 décrit pour la première fois l'interaction de ces protéines virales avec deux régulateurs majeurs de la transcription : le facteur NF-Y et la protéine Miz-1. Ces deux facteurs de transcription interagissent respectivement avec la boîte CCAAT et l'élément Inr, deux éléments retrouvés au niveau du promoteur basal de nombreux gènes cellulaires. En interagissant avec de tels régulateurs transcriptionnels les protéines EBNA3 pourraient, lors de l'infection de cellules B par le virus d'Epstein-Barr, initier une reprogrammation complète de la cellule. Les études transcriptomiques sur l'effet des EBNA3 étant bien avancées, il serait maintenant intéressant de chercher la présence des éléments cibles des protéines EBNA3 sur les promoteurs des gènes qu'elles régulent.

Partie 2 : Caractérisation de l'interaction entre EBNA1 et RCC1

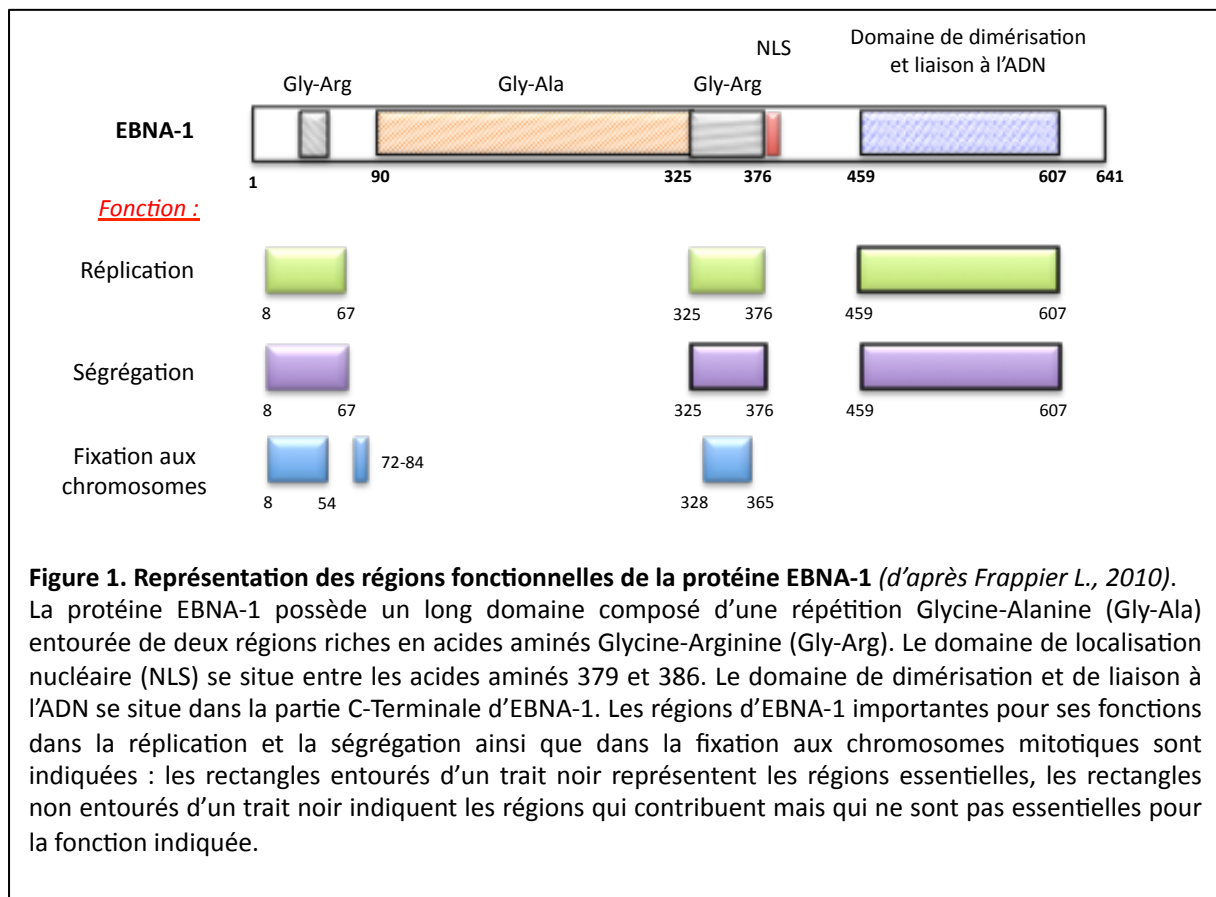
Chapitre I : Introduction sur la protéine EBNA1

EBNA-1 est une protéine qui joue un rôle essentiel dans l'infection de cellules par EBV. Elle est de plus la seule protéine virale retrouvée dans toutes les pathologies associées au virus. EBNA-1 est en effet requise pour le maintien de l'épisome viral en jouant un rôle dans la réplication ainsi que dans la ségrégation du génome d'EBV lors de la mitose. De plus, il est connu que la protéine EBNA-1 joue un rôle dans l'expression des autres gènes de latence viraux. Toutes ces fonctions impliquent la fixation d'EBNA-1 à l'ADN sur le génome viral. Enfin, EBNA-1 semble aussi altérer différentes voies cellulaires, facilitant ainsi l'infection virale et contribuant à l'immortalisation des cellules.

I. Structure de la protéine d'EBNA-1

La protéine EBNA-1 est codée par la phase de lecture BKRF1. L'ARN messager codant pour la protéine EBNA-1 a la particularité d'être transcrit à partir de quatre promoteurs viraux différents. Au début de l'infection la transcription est initiée au promoteur Wp, puis passe au promoteur Cp. Le transcrit primaire dérivant de ces deux promoteurs est très long (50-70 Kpb) et ne contient pas que la séquence codante pour EBNA-1 mais celles de tous les EBNA. En latence de type I et II, pendant lesquelles EBNA-1 est la seule protéine virale nucléaire produite, les promoteurs Cp et Wp sont rendus inactifs par méthylation d'îlots CpG (Schaefer et al., 1997) et la transcription de BKRF1 est initiée à partir d'un autre promoteur, le promoteur Qp (Schaefer et al., 1995a). Le quatrième promoteur permettant l'expression d'un ARNm codant pour EBNA-1 est le promoteur Fp. Ce dernier semble être activé à l'entrée du virus dans le cycle productif (Schaefer et al., 1995b). Ces différents promoteurs fournissent différents transcrits d'EBNA-1 en fonction de la phase d'infection d'EBV (Zetterberg et al., 1999). Du fait du polymorphisme de la région IR3 qui est incluse dans l'ORF codant pour EBNA-1, cette dernière a un poids moléculaire différent suivant les souches virales (Hennessy et al., 1983). La protéine EBNA-1 provenant de la souche B95-8 (souche prototype) a une longueur de 641 acides aminés et une taille de 56 kDa.

EBNA-1 est une protéine nucléaire composée d'un domaine N-Terminal basique, d'une séquence répétée d'acides aminés Glycine-Alanine (Gly-Ala), suivie de nouveau par une petite région d'acides aminés basiques comprenant le domaine de localisation nucléaire (NLS) et un long domaine C-Terminal hydrophobe (**Fig 1**). Ce domaine C-Terminal comprend la région de fixation à l'ADN ainsi que la région de dimérisation d'EBNA-1 (Polvino-Bodnar et al., 1988; Ambinder et al., 1991; Chen et al., 1993).



I. 1. Le domaine glycine-alanine de la protéine EBNA-1

La plupart des protéines virales de latence d'EBV provoquent une forte réponse immunitaire de l'hôte et par conséquent des cellules exprimant toutes les protéines de latence sont rarement retrouvées chez un individu immunocompétent (Babcock et al., 2000). EBNA-1 est la seule protéine d'EBV à être exprimée dans toutes les différentes formes de latence (exceptée la latence 0) observées dans les cellules infectées par EBV et bien qu'EBNA-1 soit une protéine virale, donc étrangère à la cellule hôte, les cellules infectées par EBV et exprimant EBNA-1 ne sont pas ou très peu reconnues par le système immunitaire. Ceci est dû essentiellement à l'effet inhibiteur de la séquence Gly-Ala d'EBNA-1 qui empêche sa dégradation par le protéasome (Levitskaya et al., 1997) et ainsi la présentation d'antigènes d'EBNA-1 par le CMH de classe 1 aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (Levitskaya et al., 1995). En effet, la délétion de cette séquence Gly-Ala restaure la présentation d'EBNA-1 par le CMH de classe I tandis que l'addition de la séquence Gly-Ala à la protéine EBNA-3B inhibe sa reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques (Levitskaya et al., 1995). Le

domaine Gly-Ala permettrait donc à la protéine EBNA-1 de ne pas être reconnue par le système immunitaire.

Cependant, cette idée qu'EBNA-1 échappe au système immunitaire est remise en cause depuis quelques années. En effet, alors que d'anciennes études *in vitro* ont montré qu'EBNA-1 n'était pas reconnue par les lymphocytes T CD8⁺ (Murray et al.; Khanna et al., 1992), l'arrivée des nouvelles technologies permettant des analyses *ex-vivo* ont permis de montrer que des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour EBNA-1 sont retrouvés chez des porteurs sains d'EBV et que ces LT CD8⁺ peuvent reconnaître des épitopes d'EBNA-1 à la surface des cellules infectées par EBV (Lee et al., 2004; Tellam et al., 2004; Voo et al., 2004). Ces nouvelles observations montrent qu'EBNA-1 pourrait, malgré sa séquence Gly-Ala, être présentée par la voie du CMH de classe I.

I. 2. Domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN d'EBNA-1

EBNA-1 est une protéine capable de lier l'ADN et de se fixer à des séquences spécifiques dans le génome viral. Le domaine de fixation à l'ADN se situe dans la partie C-Terminale d'EBNA-1 entre les acides aminés 459 et 607 (Rawlins et al., 1985; Ambinder et al., 1991). EBNA-1 est capable de se fixer à différents endroits du génome viral avec des affinités différentes (Jones et al., 1989). C'est pour la région FR de l'*oriP* qu'EBNA1 a la plus forte affinité, suivit de l'élément DS et enfin du promoteur Qp. Tous les sites de fixation d'EBNA-1 contiennent différentes copies d'une séquence palindromique de 18 pb (Rawlins et al., 1985; Ambinder et al., 1990). Toutes les copies de ces séquences d'ADN ne sont pas identiques dans le génome d'EBV mais contiennent quelques variations pouvant ainsi expliquer les différences d'affinités observées pour l'interaction avec EBNA-1.

La protéine EBNA-1 forme des homodimères aussi bien en solution qu'en interaction avec l'ADN. La forme active d'EBNA-1 se fixant à l'ADN est un dimère, et le domaine de dimérisation d'EBNA-1 se situe dans la partie C-Terminale de la protéine (comme le domaine de fixation à l'ADN) entre les acides aminés 459 et 607. (Ambinder et al., 1991; Frappier and O'Donnell, 1991; Shah et al., 1992). La structure cristallographique d'EBNA-1 fixée à l'ADN a été résolue en solution (Bochkarev et al., 1995, 1996) (**Fig 2**). Le domaine de dimérisation d'EBNA-1 a été cartographié entre les acides aminés 504 et 607 (appelé domaine central). Cette région dimérisée d'EBNA-1 forme un tonneau de huit feuillets β (comprenant 4 feuillets β provenant de chacun des monomères) entouré de deux hélices α . Ce

domaine central est similaire au niveau structural au domaine de fixation à l'ADN de la protéine E2, homologue fonctionnel d'EBNA-1 du papillomavirus bovin permettant le maintien et la ségrégation du virus bovin lors des divisions cellulaires (Lehman and Botchan, 1998; Bastien and McBride, 2000). Les résidus 470-503 qui entourent le domaine central, appelé domaine flanquant, comprennent un bras peptidique qui vient s'enchâsser dans le petit sillon de l'ADN (aa 461-476), une hélice α orientée perpendiculairement à l'ADN (aa 477-489) et un connecteur (aa 490-503) faisant le lien avec le domaine central. Le domaine central est capable à lui seul de fixer l'ADN, mais il a été montré que le domaine flanquant est lui aussi important et permet d'augmenter l'affinité d'EBNA-1 pour l'ADN (Cruickshank et al., 2000).

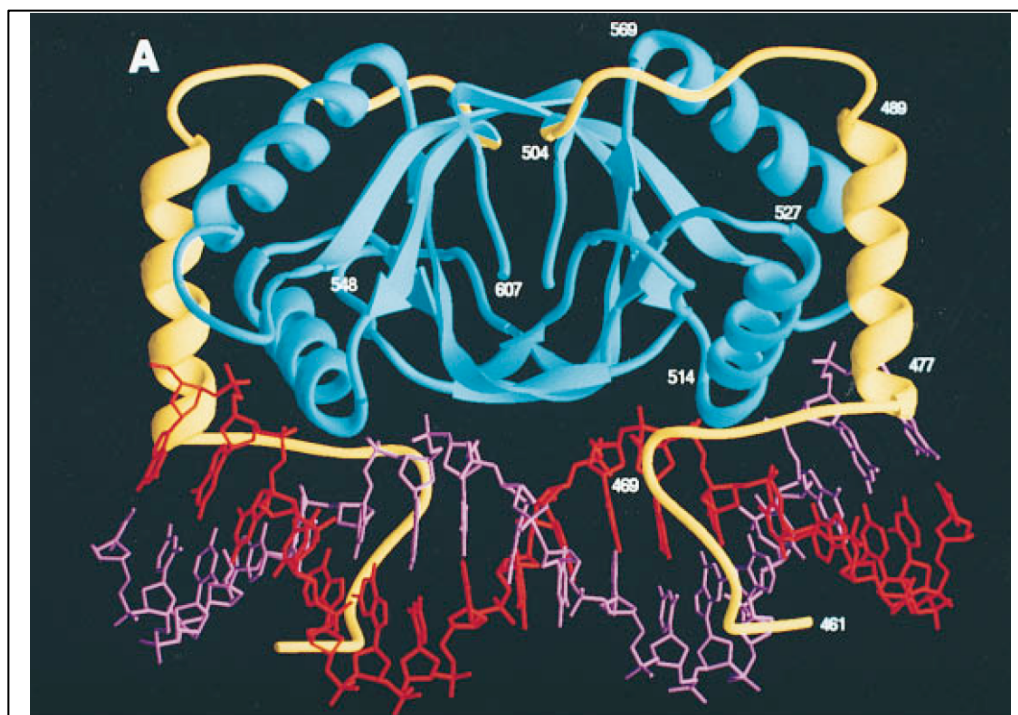


Figure 2. Dimère d'EBNA-1 fixé sur l'ADN (Bochkarev et al., 1996).

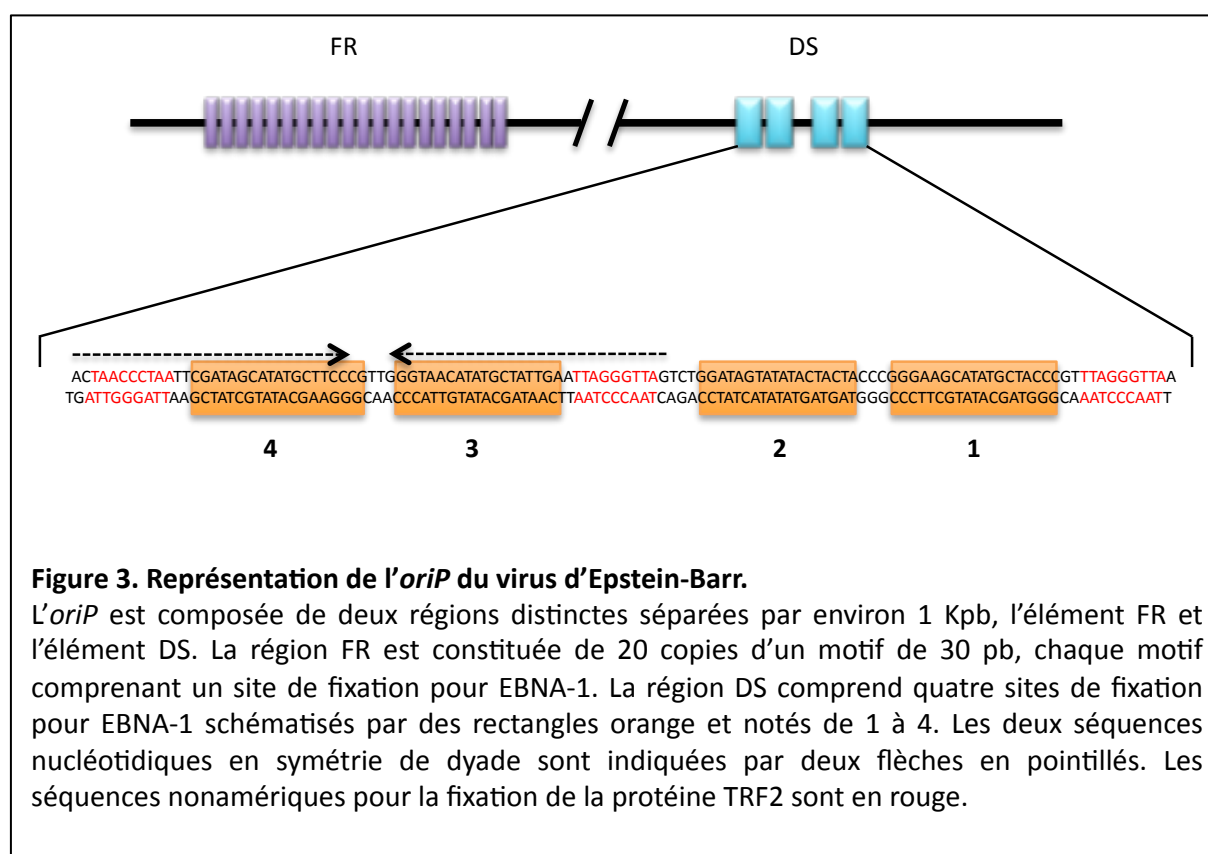
Le domaine central d'EBNA-1, qui contient les acides aminés 504-607 de chaque monomère, est en bleu. Les domaines flanquants de chaque monomère sont en jaune. Les acides aminés sont notés par rapport à leurs positions dans la protéine EBNA-1 de la souche B95-8.

Enfin, il a été montré que la fixation d'EBNA-1 à l'ADN entraîne un changement de conformation de l'ADN (Bochkarev et al., 1996). En effet, l'ADN est localement sous-enroulé et surenroulé. Ce changement de conformation de l'ADN serait dû à l'interaction d'EBNA-1 avec le petit sillon de l'ADN et pourrait faciliter la mise en place du complexe de

réplication (Bashaw and Yates, 2001). Par ailleurs, la protéine EBNA-1 est aussi capable de fixer l'ARN grâce à des motifs RGG situés dans les régions riches en Glycine-Arginine (Snudden et al., 1994).

II. Fonction de la protéine EBNA-1 dans le maintien de l'épisome viral

La protéine EBNA-1 est principalement connue pour son rôle essentiel dans le maintien de l'épisome viral aux cours des divisions successives des cellules infectées par EBV. Lors de la latence, le génome viral est maintenu sous la forme d'épisomes multicopies, se réplique une seule fois en même temps que l'ADN cellulaire et ségrège de manière stable aux cours des différentes divisions cellulaires. L'origine de réplication virale utilisée lors de la latence est appelée *oriP* (Origine de réplication plasmidique) (Yates et al., 1984) (**Fig 3**).



Cet *oriP* est composée de deux parties distinctes, la région FR (Family of Repeats) et la région DS (Dyad Symetry), toutes deux séparées par 960 pb (Reisman et al., 1985). La région DS, longue de 120 pb, comprend quatre sites de fixation pour EBNA-1. La région FR

quant à elle consiste en 20 copies d'un motif de 30 pb. Chaque motif répété comprend 18 pb correspondant au site de fixation pour EBNA-1 suivi de 12 pb riches en nucléotides AT (Rawlins et al., 1985; Reisman et al., 1985). La réplication et la ségrégation de l'épisome viral nécessitent à la fois EBNA-1 et l'*oriP*.

II. 1. Rôle d'EBNA-1 dans la réplication du génome viral

La réplication d'un plasmide contenant une séquence *oriP* ne nécessite qu'une seule protéine virale, EBNA-1 (Yates et al., 1985). Comme l'épisome viral d'EBV, un plasmide portant un *oriP* ne se réplique qu'une seule fois par cycle cellulaire et une forte expression d'EBNA-1 n'augmente pas le nombre de copies de plasmide répliqué (Sternås et al., 1990; Yates and Guan, 1991). L'élément DS est essentiel à la réplication de l'épisome viral et a aussi été montré comme suffisant pour la réplication d'un plasmide *oriP* dans des cellules humaines exprimant EBNA-1 (Wysokenski and Yates, 1989; Harrison et al., 1994; Yates et al., 2000). Ces données indiquent que l'élément DS est l'origine de réplication dans l'*oriP*. De plus, des études ont montré que la fourche de réplication était initiée au niveau de l'élément DS (Gahn and Schildkraut, 1989).

II. 1. 1. Interaction EBNA-1-ADN

Le domaine de fixation à l'ADN d'EBNA-1 se trouve dans la partie C-Terminale de la protéine. Cependant, bien que ce domaine soit essentiel à la fonction de réplication, la partie N-Terminale d'EBNA-1 est aussi requise (Kirchmaier and Sugden, 1997; Ceccarelli and Frappier, 2000; Wu et al., 2002) (**Fig 1**). En effet, la fonction de réplication d'EBNA-1 semble impliquer deux régions distinctes dans la partie N-Terminale (acides aminés 8-67 et 325-376). Au contraire, les délétions des régions 61-83 et 395-450 entraînent une augmentation de l'efficacité de réplication (Wu et al., 2002; Holowaty et al., 2003). Il a d'ailleurs été montré que deux mutations ponctuelles dans ces régions causaient la même augmentation d'efficacité de réplication. Ces mutations ponctuelles, G81A et G425A, inhibent l'interaction d'EBNA-1 avec la Tankyrase, une poly-ADP-ribose polymérase (PARP), suggérant que la Tankyrase régule négativement la réplication initiée par EBNA-1 (Deng et al., 2005).

La réplication d'un plasmide à partir de l'*oriP* nécessite les quatre sites de fixation d'EBNA-1 au niveau de la région DS ainsi que les trois séquences nonamériques répétées

flanquant les sites de fixation d'EBNA-1 (Koons et al., 2001; Lindner et al., 2008) (**Fig 3**). Cependant, la réplication peut avoir lieu avec seulement deux sites de fixation d'EBNA-1 adjacents (soit le site 1+2 ou 3+4) mais est beaucoup moins efficace. Cette réplication est aussi stimulée par les séquences nonamériques flanquant les sites de fixation d'EBNA-1 (Harrison et al., 1994; Koons et al., 2001; Atanasiu et al., 2006). Enfin, l'espace entre deux sites de fixation d'EBNA-1 est crucial pour la réplication. En effet, la délétion des 3 paires de bases entre les sites 1+2 ou 3+4 inhibe la réplication et la séquence nucléotidique de ces trois paires de bases ne semble pas avoir d'importance (Bashaw and Yates, 2001). Cet espace serait en effet seulement nécessaire pour accommoder la déformation de l'ADN induite par EBNA-1.

II. 1. 2. Recrutement de protéines cellulaires sur l'*oriP*

La protéine EBNA-1 est donc la seule protéine virale requise pour la réplication du génome d'EBV. Cependant il semble qu'EBNA-1 ne possède aucune activité enzymatique, comme par exemple une activité ADN hélicase. La réplication de l'ADN viral dépend donc aussi de plusieurs protéines cellulaires de l'hôte (Frappier and O'Donnell, 1991). Il a notamment été montré que les facteurs humains d'initiation de la réplication, les complexes ORC (origin recognition complex) et MCM (minichromosome maintenance), s'associent à l'élément DS de l'*oriP* pendant la phase G₁ du cycle cellulaire, les impliquant dans l'initiation de la réplication de l'ADN viral (Chaudhuri et al., 2001; Schepers et al., 2001). Le complexe de reconnaissance de l'origine (ORC) est un complexe formé d'un hexamère de protéines apparentées (ORC1 à ORC6). Ce complexe se fixe aux origines de réplication et recrute les protéines CDC6 et CDT1. Ces deux protéines coopèrent alors avec l'ORC afin de charger le complexe MCM, composé lui aussi d'un hexamère de sous-unités formant l'hélicase de la réplication cellulaire. Toutes ces protéines forment le complexe de pré-réplication, complexe qui sera activé en phase S (Harvey and Newport, 2003).

L'implication du complexe ORC dans l'initiation de la réplication du génome viral est confortée par le fait qu'un plasmide *oriP* ne peut pas se maintenir dans des lignées cellulaires mutées pour le gène *ORC2* (Dhar et al., 2001). De plus, il a été montré que la réplication par l'*oriP* est inhibée par la géminine, protéine qui inhibe la réplication en interagissant avec la protéine CDT1 (Dhar et al., 2001). Le recrutement du complexe ORC au niveau de l'*oriP* nécessite la présence de la protéine EBNA-1 (Julien et al., 2004), par interaction directe avec le complexe ORC (Dhar et al., 2001; Schepers et al., 2001) et / ou par le changement de

conformation de l'ADN induit par la fixation d'EBNA-1 sur ses séquences cibles. De manière intéressante le complexe ORC n'est pas recruté par EBNA-1 fixée sur la région FR, ce qui suggère que la séquence d'ADN ou l'arrangement des sites de fixation d'EBNA-1 sur l'élément DS est important pour ce recrutement (Chaudhuri et al., 2001; Dhar et al., 2001). Enfin, des études récentes ont montré un rôle de la protéine TFR2 (telomere repeat factor 2), protéine jouant un rôle dans la protection des télomères (Lange, 2004), attachée aux séquences nanométriques répétées sur l'élément DS dans le recrutement du complexe ORC (Atanasiu et al., 2006; Lindner et al., 2008). En effet, TFR2 interagit directement avec la protéine ORC1 et il a été montré que les séquences nanométriques auxquelles se fixe TRF2, augmentent la capacité à recruter le complexe ORC au niveau de l'élément DS, même si chaque paire de site de fixation pour EBNA-1 (1+2 ou 3+4) est suffisante pour le recrutement d'ORC.

II. 2. Rôle d'EBNA-1 dans le maintien du génome viral

II. 2. 1. Ségrégation de l'épisome d'EBV

La ségrégation de l'épisome d'EBV durant les divisions cellulaires requiert la protéine EBNA-1 et l'élément FR de l'*oriP* (Lupton and Levine, 1985; Lee et al., 1999). Des plasmides contenant juste l'élément FR et des séquences hétérologues d'initiation de la réplication sont capables de se maintenir dans les cellules en présence d'EBNA-1 (Krysan et al., 1989). Le génome d'EBV possède aussi une séquence d'attachement à la matrice nucléaire (MAR) adjacente à l'*oriP* jouant un rôle dans le maintien de l'épisome viral. (Jankelevich et al., 1992). Il a notamment été montré que des plasmides contenant la région MAR étaient plus efficacement maintenus par rapport aux mêmes plasmides contenant seulement l'*oriP* (White et al., 2001).

Lors de la mitose, la protéine EBNA-1 interagit avec les chromosomes cellulaires (Petti et al., 1990). De plus, l'épisome d'EBV est retrouvé associé aux chromosomes durant la mitose (Harris et al., 1985). Il a donc été suggéré qu'EBNA-1 permet la ségrégation de l'épisome viral grâce à cet attachement aux chromosomes mitotiques. L'association d'un plasmide portant l'*oriP* aux chromosomes mitotiques a été montré comme étant dépendant de la présence de la protéine EBNA-1 (Kanda et al., 2001). Enfin, la région d'EBNA-1

responsable de l'attachement aux chromosomes peut être efficacement remplacée par celle de protéines cellulaires (HMG-1 et histone H1) liant les chromosomes (Hung et al., 2001).

II. 2. 2. Distribution des épisomes d'EBV dans les cellules filles

La protéine EBNA-1 et l'épisome viral ne sont pas localisés sur des régions spécifiques des chromosomes, cependant, le génome d'EBV est distribué également entre deux cellules filles après division cellulaire. Il doit donc exister un mécanisme permettant cette répartition égale de l'épisome viral après chaque division cellulaire. Il a été montré que lors de la mitose, EBNA-1 co-localise avec le génome d'EBV et que le complexe épisome-EBNA-1 est retrouvé de manière symétrique sur les chromatides sœurs (Kanda et al., 2007).

II. 2. 3. EBNA-1 interagit avec les chromosomes

Les régions responsables de la fixation d'EBNA-1 aux chromosomes ont été identifiées en fusionnant différentes parties d'EBNA-1 à la GFP et en regardant leurs localisations cellulaires au moment de la mitose (Marechal et al., 1999). Trois séquences ont été identifiées par cette technique, une première entre les acides aminés 8-54, une deuxième entre les acides aminés 72-84 et une dernière entre les acides aminés 328-365. Ces trois séquences peuvent indépendamment interagir avec les chromosomes, suggérant qu'elles peuvent avoir une contribution redondante dans l'attachement d'EBNA-1 aux chromosomes.

Les séquences responsables de la fixation aux chromosomes ont aussi été identifiées en utilisant des mutants de délétions dans le contexte de la protéine EBNA-1 entière. Alors que la délétion entre les acides aminés 8 et 67 n'affecte que partiellement l'attachement aux chromosomes et la ségrégation d'un plasmide *oriP* (Wu et al., 2002), la délétion de la région entre les acides aminés 325 et 376 affecte sévèrement l'attachement d'EBNA-1 aux chromosomes et la fonction de ségrégation (Shire et al., 1999; Wu et al., 2000b). Cette région 325-376 est riche en acides aminés Glycine-Arginine et contient quatre copies d'une séquence de huit acides aminés, chacune contenant une sérine pouvant être phosphorylée. L'analyse de ces sérines a montré que la phosphorylation de ces acides aminés participait à la fonction de ségrégation d'EBNA-1 (Shire et al., 2006). Les résidus importants de la région comprise entre les acides aminés 8-67 qui affecte partiellement la fonction de ségrégation d'EBNA-1, n'ont pas encore été localisés précisément. Cette région contient un domaine riche en Glycine-

Arginine comme la région 325-376, cependant la délétion de ce domaine (aa 34-52) n'affecte pas la ségrégation ni l'attachement d'EBNA-1 aux chromosomes (Wu et al., 2002). Enfin, la possible contribution du domaine compris entre les acides aminés 72 à 84 d'EBNA-1, identifié par Marechal et ses collaborateurs (Marechal et al., 1999), a aussi été testée par Wu et ses collègues dans le maintien d'un plasmide contenant l'*oriP* (Wu et al., 2002). Ces derniers ont utilisé un mutant d'EBNA-1 comportant une délétion du domaine entre les acides aminés 61-83 et ont montré que ce mutant permet toujours le maintien d'un plasmide contenant l'*oriP*.

II. 2. 4. Mécanismes d'attachement d'EBNA-1 aux chromosomes

Les mécanismes impliqués dans la ségrégation du génome d'EBV au cours des divisions cellulaires ne sont pas encore complètement élucidés et bien qu'une protéine cellulaire, appelée EBP2, ait été proposée pour servir de lien entre EBNA-1 et les chromosomes métaphasiques, ces résultats ont été récemment controversés.

EBP2 est une protéine interagissant directement avec les chromosomes (Wu et al., 2000b; Kapoor and Frappier, 2003) qui a initialement été identifiée lors d'un crible deux-hybrides comme un partenaire de la protéine EBNA-1 (Shire et al., 1999). Le domaine d'EBNA-1 interagissant avec EBP2 est la région 325-376, région fixant les chromosomes et responsable du maintien d'un plasmide *oriP*. De plus, la phosphorylation des acides aminés sérines de la région 325-376, jouant un rôle dans la fonction de maintien de l'épisome par EBNA-1, semble aussi influencer sur l'interaction avec EBP2 (Shire et al., 2006). Un rôle direct de l'implication d'EBP2 dans le maintien d'un plasmide *oriP* par EBNA-1 a été montré par Kapoor et ses collaborateurs dans un système en levure (Kapoor et al., 2001), utilisant un plasmide contenant une origine de réplication de levure (ARS) et l'élément FR d'EBV. Dans les levures exprimant seulement EBNA-1 ce plasmide ne peut pas se maintenir efficacement. Le maintien de ce dernier ne s'opère qu'en présence d'EBNA-1 et d'EBP2. Enfin, ce plasmide ne se maintient pas dans les levures exprimant EBP2 et le mutant 325-376 d'EBNA-1. Dans les levures, EBP2 et EBNA-1 sont associées aux chromosomes au moment de la mitose et l'attachement d'EBNA-1 est dépendant d'EBP2 (Kapoor and Frappier, 2003). L'importance de l'interaction EBP2/EBNA-1 a aussi été montrée dans les cellules humaines où l'inhibition d'EBP2 par siRNA ne permet plus à EBNA-1 d'être correctement localisée au niveau des chromosomes métaphasiques (Kapoor et al., 2005). Le maintien d'un plasmide par

EBNA-1 semble donc dépendre de la protéine EBP2 qui permettrait à EBNA-1 de se fixer aux chromosomes métaphasiques.

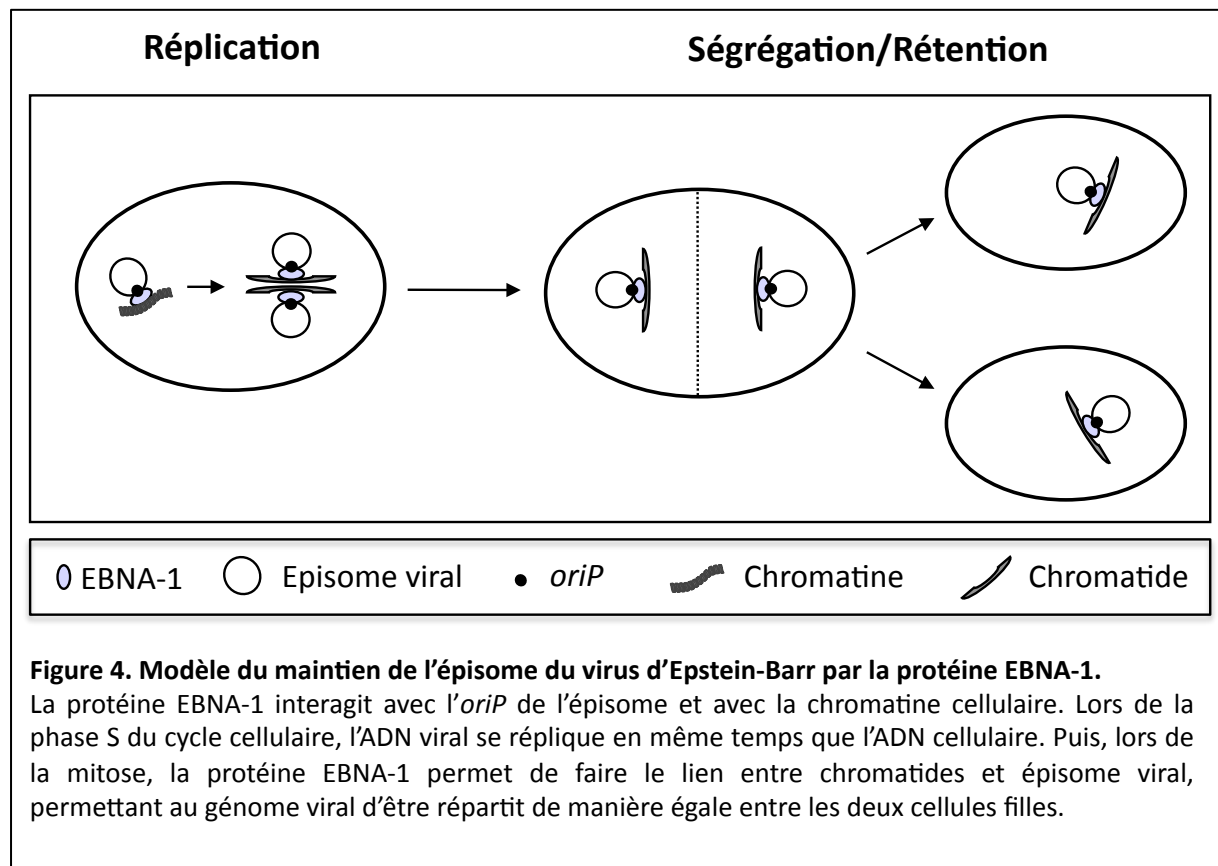
Cependant, bien que l'interaction entre EBP2 et EBNA-1 semble être importante pour la ségrégation d'un plasmide *oriP*, d'autres facteurs cellulaires doivent intervenir. En effet, l'étude de la localisation d'EBNA-1 et d'EBP2 lors de la mitose montre qu'EBNA-1 est localisée aux chromosomes dès le début de la mitose alors qu'EBP2 interagit avec les chromosomes seulement en métaphase (Nayyar et al., 2009). Très récemment, une étude plus approfondie utilisant une approche par FRET (Förster Resonance Energy Transfer) a montré que EBP2 et EBNA-1 interagissent ensemble au niveau du nucléoplasme durant l'interphase mais n'interagissent pas pendant la mitose (Jourdan et al., 2012). Ces derniers résultats remettent en cause le rôle de la protéine EBP2 comme protéine faisant le lien entre EBNA-1 et les chromosomes.

Enfin, il a aussi été proposé que la protéine EBNA-1 pourrait directement interagir avec l'ADN cellulaire grâce à ses deux séquences riche en Glycine-Arginine (aa 33-53 et aa 325-376) ressemblant fortement à des séquences que l'on appelle crochets AT (Sears et al., 2004). Sears et ses collaborateurs ont en effet montré que les séquences riches en Gly-Arg d'EBNA-1 sont capables de lier *in vitro* de l'ADN riche en di-nucléotides AT. Dans leur étude, un mutant d'EBNA-1 constitué de la région N-Terminale d'EBNA-1 (acides aminés 33-89 possédant le domaine riche en Glycine-Arginine) et du domaine de dimérisation/fixation à l'ADN est retrouvé lié aux chromosomes métaphasiques. De plus, ce mutant permet le maintien d'un plasmide *oriP* alors qu'il n'interagit pas avec EBP2 (Sears et al., 2004).

III. Conclusion

La protéine EBNA-1 du virus d'Epstein-Barr joue un rôle essentiel dans la réplication et le maintien du génome viral aux cours des divisions successives de la cellule hôte (**Fig 4**). Le modèle de ségrégation actuel de l'épisome d'EBV suggère que la protéine EBNA-1 et l'épisome viral sont associés avec les chromosomes cellulaires avant la réplication de l'ADN et sont donc répartis de manière égale avec les chromatides répliquées lors de la mitose. (Kanda et al., 2007; Nanbo et al., 2007). Cependant, et malgré beaucoup de données dans la

littérature, les mécanismes impliqués dans la ségrégation du génome viral aux cours des divisions cellulaires ne sont pas encore complètement élucidés.



Chapitre II : Résultats et Discussion

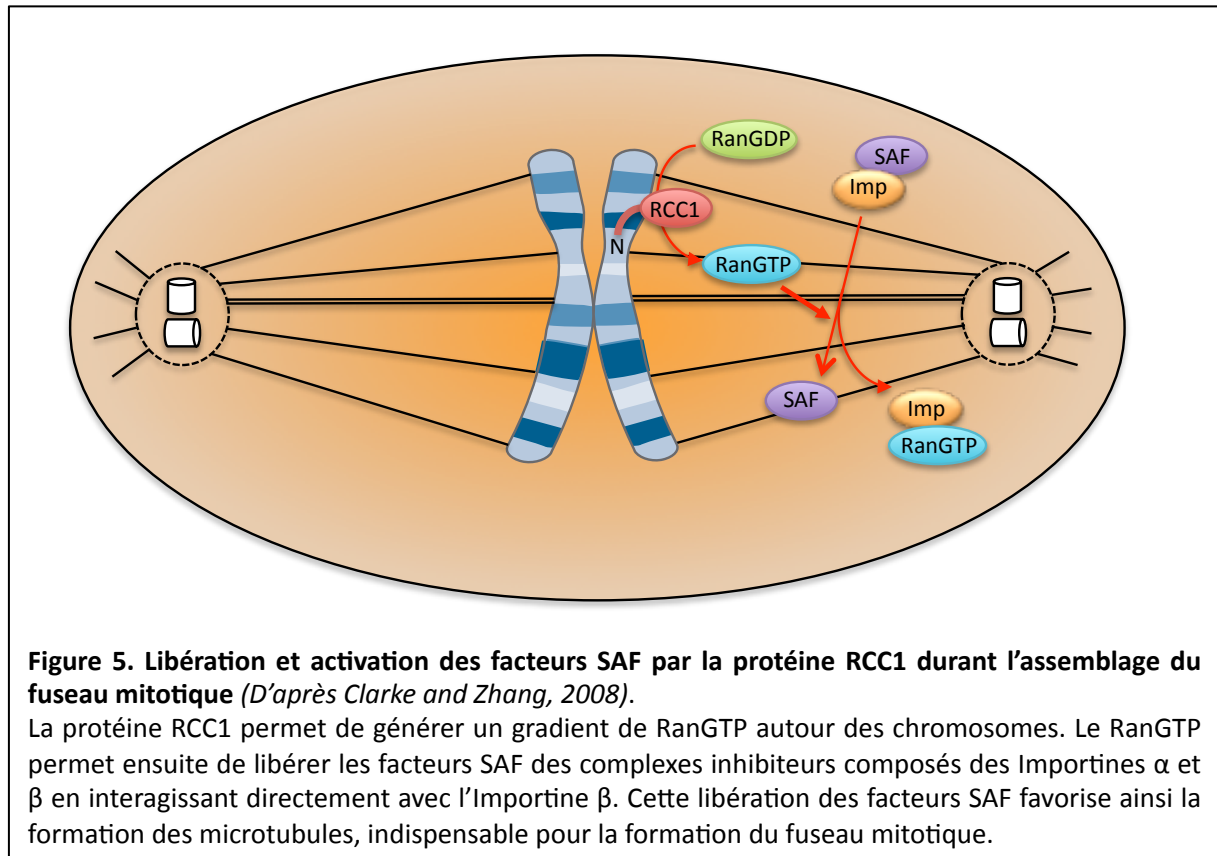
Caractérisation de l'interaction entre la protéine virale EBNA-1 et RCC1

Afin de mieux comprendre les mécanismes permettant à la protéine EBNA-1 de maintenir efficacement le génome viral, nous avons décidé d'identifier de nouveaux partenaires pour cette protéine virale par cribles deux-hybrides en levure. Par ce moyen, nous avons identifié une protéine cellulaire particulièrement intéressante, la protéine RCC1.

La protéine RCC1 (pour Régulateur de la Condensation Chromosomique 1) est un facteur échangeur de guanine (GEF) pour la GTPase Ran qui joue un rôle clé dans le transport nucléo-cytoplasmique, l'assemblage du fuseau mitotique et la formation de l'enveloppe nucléaire (Clarke and Zhang, 2008). La structure de la protéine RCC1 est parfaitement connue (Renault et al., 1998) et peut être décrite comme une hélice à 7 pales avec une queue N-Terminale flexible protubérante de 20 acides aminés. Cette partie N-Terminale est responsable de l'interaction de la protéine cellulaire RCC1 à l'ADN (Seino et al., 1992; Chen et al., 2007). Il a aussi été montré que l'association de cette petite queue N-Terminale à l'ADN est facilitée par des modifications post-traductionnelles (Li and Zheng, 2004; Chen et al., 2007; Hitakomate et al., 2010). Enfin, la protéine RCC1 est capable d'interagir avec les histones H2A et H2B (Nemergut et al., 2001).

Lors de l'initiation de la mitose, la protéine RCC1 s'associe à la chromatine et est requise pour le démarrage de la mitose (Moore et al., 2002). L'un de ses mécanismes d'action est de coupler son activité catalytique avec sa capacité à interagir avec les chromosomes, créant ainsi un gradient de RanGTP autour des chromosomes (la plus forte concentration de RanGTP étant au niveau des chromosomes) (Clarke and Zhang, 2008) (**Fig 5**). Le RanGTP va alors libérer les SAF (Spindle Assembly Factors) qui sont des protéines permettant la stimulation de l'assemblage des microtubules. En effet, ces facteurs SAF sont inactifs tant qu'ils sont en complexes avec les Importines α et β (Clarke and Zhang, 2008). En interagissant directement avec l'Importine β , RanGTP permet la libération des facteurs SAF, favorisant ainsi la formation de microtubules à proximité des chromosomes.

De par son association avec les chromosomes mitotiques et son interaction avec EBNA-1, RCC1 pourrait participer à l'ancrage des épisomes viraux au niveau des chromosomes cellulaires.

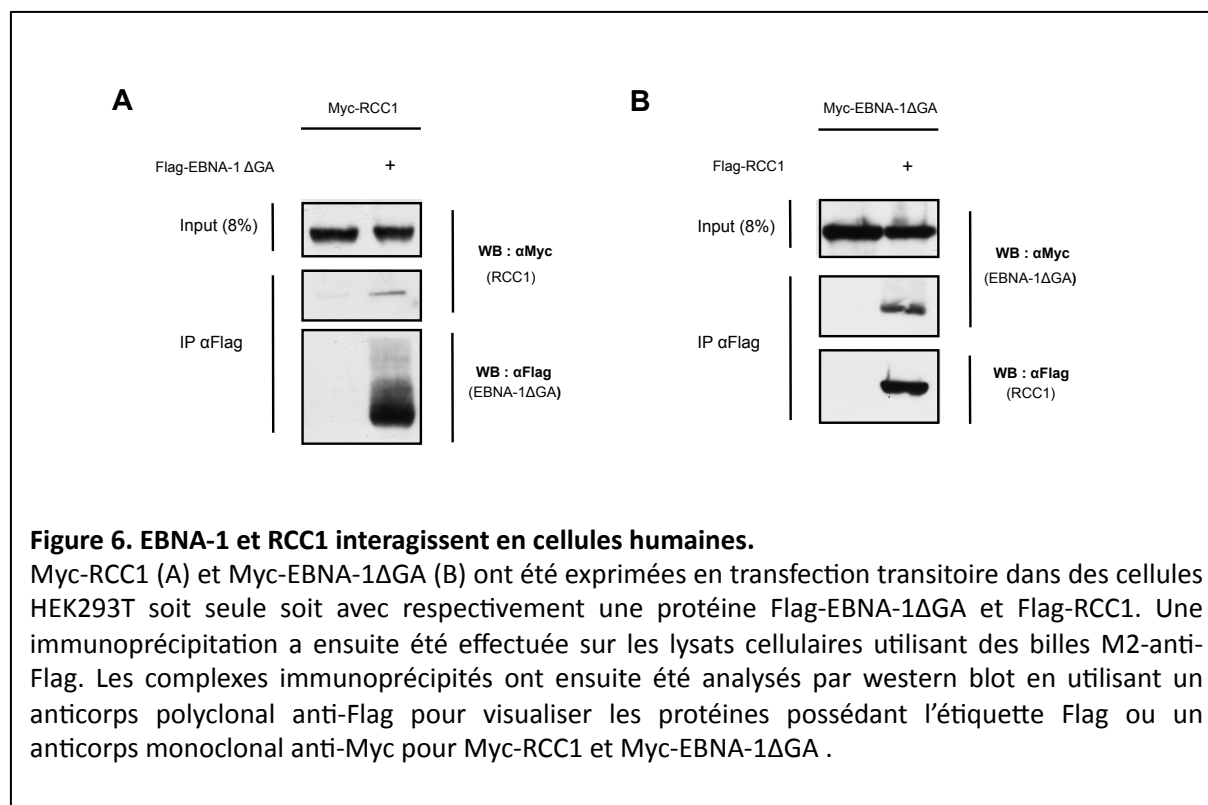


L'interaction entre la protéine virale EBNA-1 et la protéine cellulaire RCC1 initialement identifiée en crible deux-hybrides par Dimitri Mompelat (étudiant EPHE travaillant dans notre laboratoire) est donc potentiellement très intéressante du fait de l'interaction de RCC1 aux chromosomes lors de la mitose. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la protéine RCC1 et j'ai caractérisé l'interaction entre cette protéine cellulaire et EBNA-1.

I. EBNA-1 et RCC1 interagissent en cellules humaines

Puisque cette interaction a été identifiée par crible deux-hybrides en levure, la deuxième étape a été de la valider dans des cellules humaines. Nous avons choisi le système de co-immunoprécipitation (co-IP) en cellules HEK293T. Comme la protéine EBNA-1 entière s'exprime très difficilement *in vivo* nous avons utilisé un plasmide d'expression

codant une protéine EBNA-1 dépourvue de son long domaine Glycine-Arginine (protéine appelée EBNA-1 Δ GA). Lorsque la protéine EBNA-1 Δ GA est immunoprécipitée, on co-immunoprécipite la protéine RCC1 (**Fig 6A**). Inversement, lorsque l'on immunoprécipite la protéine cellulaire RCC1, on co-immunoprécipite EBNA-1 Δ GA (**Fig 6B**).



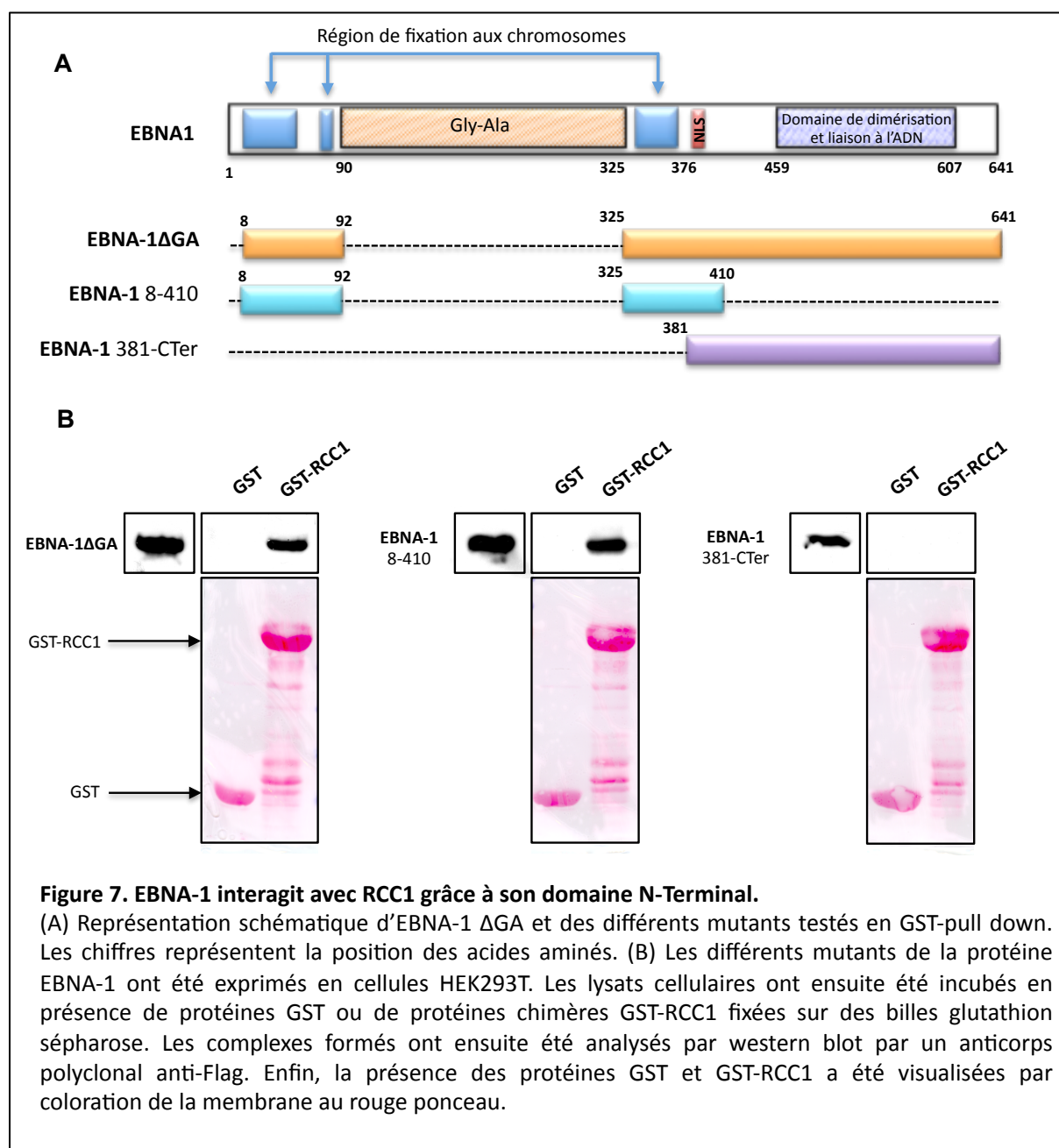
Ces expériences de co-immunoprécipitations nous ont permis de valider cette interaction en montrant qu'EBNA-1 et RCC1 interagissent en cellules humaines.

II. Caractérisation des domaines d'interaction entre les deux protéines

Après avoir validé cette interaction nous nous sommes intéressés à l'identification du ou des domaines de chaque protéine responsables de cette interaction. Nous avons pour cela utilisé la technique du GST-pull down. La protéine EBNA-1 a été exprimée en cellules humaines HEK293T et le lysat cellulaire a ensuite été incubé avec la protéine GST ou la protéine chimère GST-RCC1, toutes deux produites en bactéries et purifiées sur billes glutathion sépharose

II. 1. Caractérisation du domaine d'interaction de RCC1 dans la protéine EBNA-1

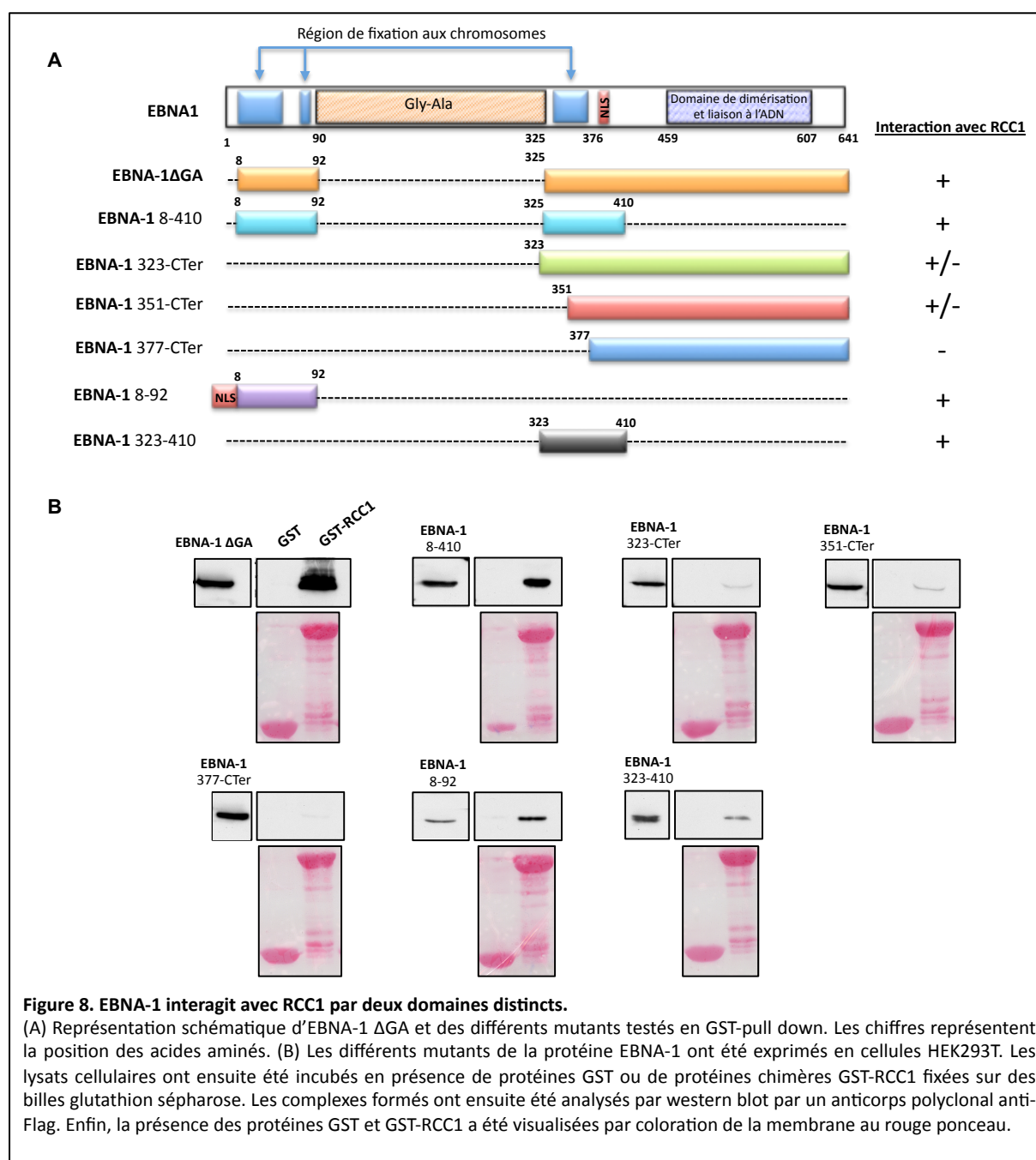
Afin de localiser la région d'EBNA-1 permettant l'interaction avec la protéine RCC1 nous avons réalisé des GST-pull down avec la protéine EBNA-1 entière (EBNA-1ΔGA) ainsi qu'un mutant exprimant la partie N-Terminale (EBNA-1 8-410) et un mutant exprimant la partie C-Terminale d'EBNA-1 (EBNA-1 381-CTer) (**Fig 7A**).



Alors que les protéines EBNA-1ΔGA et EBNA-1 8-410 interagissent très fortement avec la protéine GST-RCC1, le mutant exprimant la partie C-Terminale n'interagit pas (**Fig**

7B). La protéine virale EBNA-1 interagit donc avec RCC1 par son domaine N-Terminal, entre les acides aminés 8 à 410.

Afin de déterminer plus précisément cette région d'interaction nous avons effectué un GST-pull down avec une nouvelle série de mutants de la protéine EBNA-1 (**Fig 8A**).



Comme attendu, les protéines EBNA-1ΔGA et EBNA-1 8-410 interagissent fortement avec GST-RCC1 et n'interagissent pas avec la protéine GST seule (**Fig 8B**). De plus, alors

que le mutant EBNA-1 381-Cter n'interagit pas avec GST-RCC1 (**Fig 7B**), les mutants 323-Cter et 351-Cter interagissent encore avec GST-RCC1 bien que faiblement (**Fig 8B**). Le mutant 377-Cter n'interagit presque plus avec la protéine GST-RCC1, indiquant que la région entre les acides aminés 351 et 377 participe à l'interaction. Enfin, les mutants exprimant la région entre les acides aminés 8 à 92 (EBNA-1 8-92) et le domaine entre les acides aminés 323 à 410 interagissent avec GST-RCC1 (il est à souligner que la protéine EBNA1 8-92 ne contenant pas le NLS d'EBNA-1, nous lui avons rajouté la séquence codante pour le NLS de SV40). La protéine EBNA-1 est donc capable d'interagir avec RCC1 par au moins deux domaines, le domaine compris entre les acides aminés 8 à 92 et le domaine compris entre les acides aminés 323 à 410.

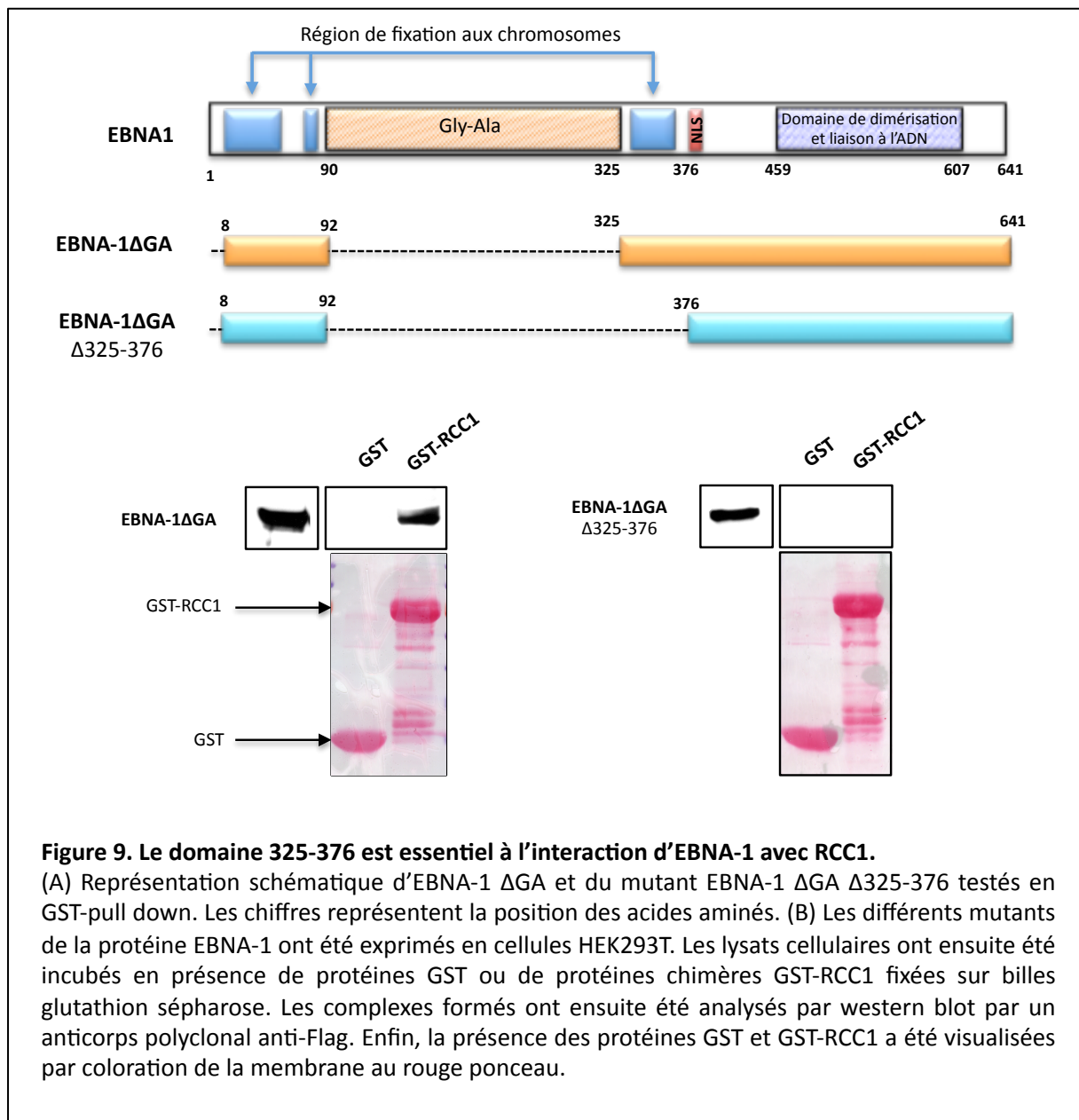
De manière intéressante, les domaines 8-54, 72-84 et 328-365 de la protéine EBNA-1 sont connus pour interagir avec les chromosomes. De plus, la région 325-376 est essentielle pour la fonction de ségrégation d'EBNA-1 (voir §II. 2. 3.). Nous avons donc testé la capacité d'une protéine EBNA-1 dépourvue de la région 325-376 à interagir avec GST-RCC1 (**Fig 9**). Alors que la protéine entière EBNA-1 Δ GA interagit avec GST-RCC1, le mutant EBNA-1 Δ GA Δ 325-376 n'est plus capable d'interagir avec GST-RCC1. Dans le contexte de la protéine entière ce domaine, situé entre les acides aminés 325 et 376, est donc essentiel à l'interaction avec RCC1.

II. 2. Caractérisation du domaine d'interaction d'EBNA-1 dans RCC1

La structure de la protéine RCC1 est parfaitement connue et peut être décrite comme une hélice à 7 pales avec une queue N-Terminale flexible protubérante de 20 acides aminés. Cette partie N-Terminale est le site de plusieurs modifications post-traductionnelles (phosphorylations et méthylation) et est impliquée dans l'interaction de RCC1 à la chromatine (**Fig 10A**).

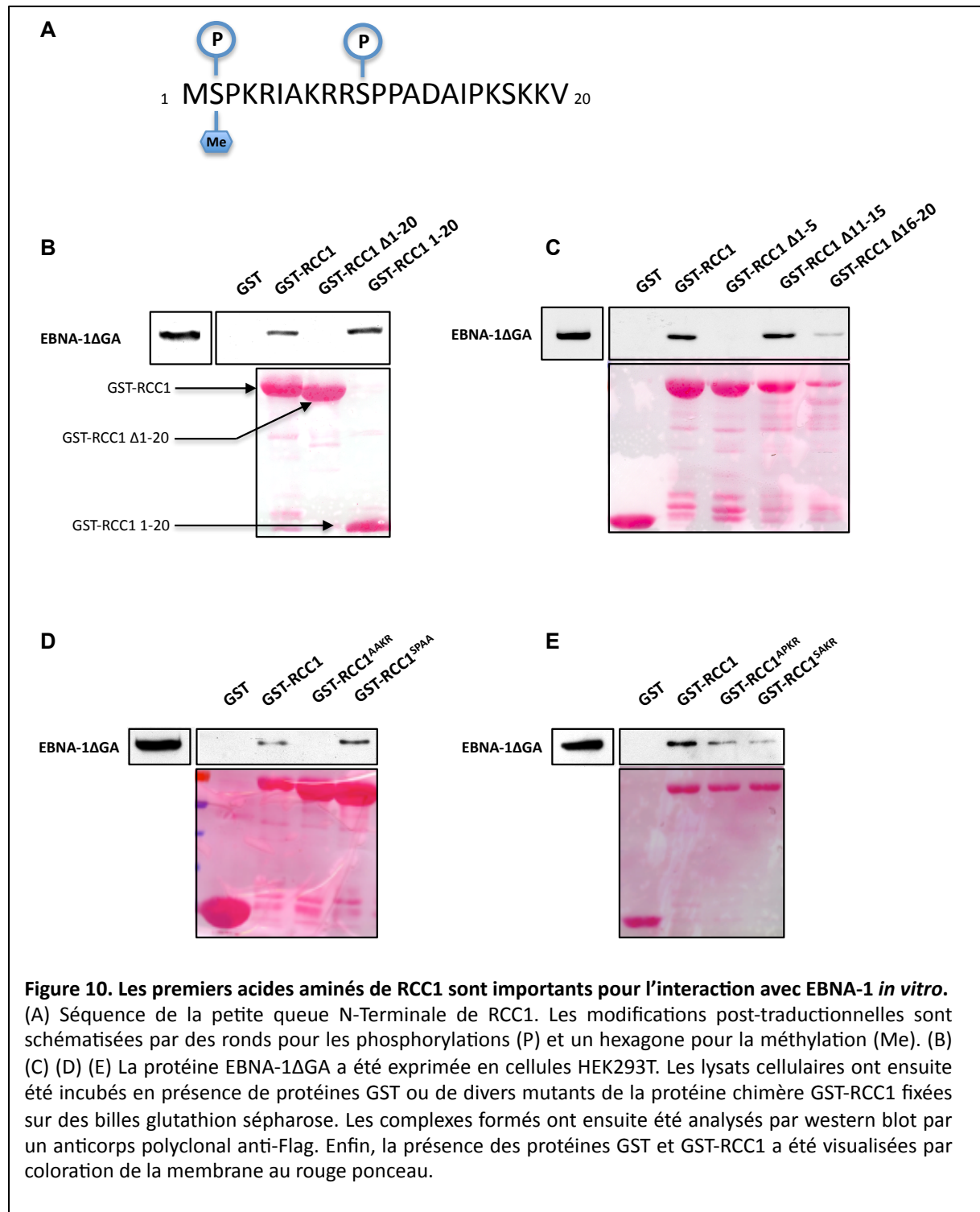
Nous avons voulu savoir, toujours par GST-pull down, si l'interaction entre EBNA-1 et RCC1 passait par cette petite queue N-Terminale. Pour cela, nous avons généré un mutant de la protéine chimère GST-RCC1 dépourvu de cette partie N-Terminale (GST-RCC1 Δ 1-20) ainsi qu'un mutant seulement composé des 20 premiers acides aminés de RCC1 (GST-RCC1 1-20). Alors que la protéine EBNA-1 Δ GA n'interagit pas avec RCC1 Δ 1-20, elle interagit

avec RCC1 1-20 (**Fig 10B**). La petite queue de 20 acides aminés de RCC1 est donc essentielle et suffisante à l'interaction *in vitro* d'EBNA-1 et RCC1.



Ensuite, nous avons voulu préciser avec quelle partie de cette petite queue N-Terminale la protéine EBNA-1 interagit. Pour cela, nous avons réalisé une série de mutants de délétion de la partie N-Terminale de RCC1 afin de les tester en GST-pull down pour leur interaction avec EBNA-1 : RCC1 Δ 1-5, RCC1 Δ 11-15 et RCC1 Δ 16-20 (le mutant RCC1 Δ 6-10 étant toujours en cours de construction). Alors que EBNA-1 Δ GA interagit avec GST-RCC1 Δ 11-16 et GST-RCC1 Δ 16-20, cette protéine n'interagit plus avec GST-RCC1 Δ 1-5 (**Fig 10C**). Il est cependant important de noter que l'interaction entre EBNA-1 Δ GA et GST-

RCC1 $\Delta 16-20$ est faible comparée à celle observée avec GST-RCC1 sauvage. Cela peut cependant s'expliquer par la quantité plus faible de protéine chimérique GST-RCC1 $\Delta 16-20$ utilisée dans cette expérience du à la difficulté d'exprimer cette protéine en bactérie. Ces résultats suggèrent donc que la protéine virale EBNA-1 interagit avec RCC1 au niveau des cinq premiers acides aminés de cette protéine cellulaire.



Afin de déterminer précisément le site d'interaction d'EBNA-1 nous avons généré deux mutants de la protéine GST-RCC1 (AAKR et SPAA) dans lesquels les acides aminés 2/3 ou 4/5 ont été remplacés par des alanines. Alors que la protéine EBNA-1ΔGA interagit avec GST-RCC1 sauvage et avec le mutant GST-RCC1^{SPAA} elle n'interagit plus avec GST-RCC1^{AAKR}, ce qui signifie que les acides aminés 2/3 de RCC1 sont importants pour l'interaction *in vitro* (**Fig 10D**). Enfin, nous avons généré deux derniers mutants de RCC1 (RCC1^{APKR} et RCC1^{SAKR}) contenant une mutation ponctuelle du deuxième ou du troisième acide aminé. Ces deux mutants interagissent toujours avec EBNA-1ΔGA, mais beaucoup plus faiblement que la protéine GST-RCC1 sauvage (**Fig 10E**). Les acides aminés 2 et 3 de RCC1 sont donc tous les deux importants pour l'interaction *in vitro* avec la protéine EBNA-1.

Chapitre III : Conclusions et Perspectives

La protéine EBNA-1 est la protéine du virus d'Epstein-Barr essentielle pour la réplication et la ségrégation du génome viral au cours des divisions successives de la cellule infectée. Cependant, le mécanisme exact par lequel EBNA-1 permet le maintien du génome d'EBV est encore peu compris.

Lors d'un crible deux-hybrides nous avons identifié un nouveau partenaire pour la protéine virale EBNA-1, la protéine RCC1. Cette interaction a ensuite été validée en cellules Humaines et les différents domaines responsables de cette interaction ont été identifiés. Ainsi, EBNA-1 interagit *in vitro* avec la petite queue N-Terminale de RCC1 au niveau des premiers acides aminés de cette dernière. Quant à RCC1, elle semble interagir avec deux domaines d'EBNA-1, un premier domaine entre les acides aminés 8 à 92 et un deuxième domaine entre les acides aminés 323 à 410. De plus, lorsque la protéine entière EBNA-1 est dépourvue du second domaine d'interaction (323-410) cette dernière n'est plus capable d'interagir *in vitro* avec RCC1. Ces deux régions d'EBNA-1 avec lesquelles la protéine RCC1 interagit sont connues pour interagir indépendamment avec les chromosomes. De plus, dans le contexte de la protéine EBNA-1 entière, la délétion de la région entre les acides aminés 323 à 410 affecte l'attachement d'EBNA-1 aux chromosomes ainsi que la fonction de ségrégation liée à EBNA-1. Enfin, il est connu dans la littérature que la protéine cellulaire RCC1 est capable de se lier aux chromosomes mitotiques. Tous ces résultats renforcent donc l'hypothèse d'un rôle de la protéine cellulaire RCC1 dans le maintien de l'épisome viral en interagissant avec EBNA-1 lors de la mitose.

Actuellement, un étudiant en thèse au laboratoire, Thibaut Deschamps, travaille sur cette interaction et ses premiers résultats sont très encourageants. En effet, il a d'ores et déjà montré par une technique de FRET, que les protéines EBNA-1 et RCC1 interagissent au niveau des chromosomes lors de la mitose. Thibaut travaille maintenant à démontrer le rôle de la protéine RCC1 dans le maintien de l'épisome viral au cours des divisions cellulaires.

Références bibliographiques

Abbot, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., and Rickinson, A.B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol* 64, 2126–2134.

Abraham, R.T. (2001). Cell Cycle Checkpoint Signaling Through the ATM and ATR Kinases. *Genes Dev.* 15, 2177–2196.

Adhikary, S., Peukert, K., Karsunky, H., Beuger, V., Lutz, W., Elsässer, H.-P., Möröy, T., and Eilers, M. (2003). Miz1 Is Required for Early Embryonic Development during Gastrulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7648–7657.

Addinger, H.K., Delius, H., Freese, U.K., Clarke, J., and Bornkamm, G.W. (1985). A putative transforming gene of Jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology* 141, 221–234.

Adler, A.S., Lin, M., Horlings, H., Nuyten, D.S.A., van de Vijver, M.J., and Chang, H.Y. (2006). Genetic regulators of large-scale transcriptional signatures in cancer. *Nature Genetics* 38, 421–430.

Adler, B., Schaadt, E., Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Baier, B., and Bornkamm, G.W. (2002). Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 437–442.

Albelda, S.M., Mette, S.A., Elder, D.E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., and Buck, C.A. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 50, 6757–6764.

Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* 181, 595–608.

Ali, A., Zhang, J., Bao, S., Liu, I., Otterness, D., Dean, N.M., Abraham, R.T., and Wang, X.-F. (2004). Requirement of protein phosphatase 5 in DNA-damage-induced ATM activation. *Genes Dev.* 18, 249–254.

Allan, G.J., Inman, G.J., Parker, B.D., Rowe, D.T., and Farrell, P.J. (1992). Cell Growth Effects of Epstein—Barr Virus Leader Protein. *J Gen Virol* 73, 1547–1551.

Allday, M.J., Crawford, D.H., and Griffin, B.E. (1988). Prediction and demonstration of a novel Epstein-Barr virus nuclear antigen. *Nucleic Acids Res* 16, 4353–4367.

Allday, M.J., Crawford, D.H., and Griffin, B.E. (1989). Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 7), 1755–1764.

Allday, M.J., Crawford, D.H., and Thomas, J.A. (1993). Epstein—Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 6 Induces Expression of the EBV Latent Membrane Protein and an Activated Phenotype in Raji Cells. *J Gen Virol* 74, 361–369.

Allday, M.J., and Farrell, P.J. (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G1-arrested cells. *J Virol* 68, 3491–3498.

- Allen, M.D., Young, L.S., and Dawson, C.W. (2005). The Epstein-Barr Virus-Encoded LMP2A and LMP2B Proteins Promote Epithelial Cell Spreading and Motility. *Journal of Virology* 79, 1789–1802.
- Ambinder, R.F., Mullen, M.A., Chang, Y.N., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1991). Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J Virol* 65, 1466–1478.
- Ambinder, R.F., Shah, W.A., Rawlins, D.R., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1990). Definition of the sequence requirements for binding of the EBNA-1 protein to its palindromic target sites in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 64, 2369–2379.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., and Stein, H. (1995). Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85, 744–750.
- Andersson, P., McGuire, J., Rubio, C., Gradin, K., Whitelaw, M.L., Pettersson, S., Hanberg, A., and Poellinger, L. (2002). A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 9990–9995.
- Andersson-Anvret, M., Forsby, N., Klein, G., and Henle, W. (1977). Relationship between the Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: correlated nucleic acid hybridization and histopathological examination. *Int. J. Cancer* 20, 486–494.
- Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, R.E., and Allday, M.J. (2007). Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 27, 421–433.
- Ansieau, S., and Leutz, A. (2002). The Conserved Mynd Domain of BS69 Binds Cellular and Oncoviral Proteins Through a Common PXLXP Motif. *J. Biol. Chem.* 277, 4906–4910.
- Arrand, J.R., and Rymo, L. (1982). Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *Journal of Virology* 41, 376.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E. (1995). Notch signaling. *Science* 268, 225–232.
- Asso-Bonnet, M., Feuillard, J., Ferreira, V., Bissières, P., Tarantino, N., Körner, M., and Raphael, M. (1998). Relationship between IkappaBalpha constitutive expression, TNFalpha synthesis, and apoptosis in EBV-infected lymphoblastoid cells. *Oncogene* 17, 1607–1615.
- Atanasiu, C., Deng, Z., Wiedmer, A., Norseen, J., and Lieberman, P.M. (2006). ORC binding to TRF2 stimulates OriP replication. *EMBO Rep* 7, 716–721.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Freeman, R.B., and Thorley-Lawson, D.A. (1999). Epstein-Barr Virus-Infected Resting Memory B Cells, Not Proliferating Lymphoblasts, Accumulate in the Peripheral Blood of Immunosuppressed Patients. *J Exp Med* 190, 567–576.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D.A. (1998). EBV Persistence in Memory B Cells In Vivo. *Immunity* 9, 395–404.

- Babcock, G.J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, D.A. (2000). The Expression Pattern of Epstein-Barr Virus Latent Genes In Vivo Is Dependent upon the Differentiation Stage of the Infected B Cell. *Immunity* 13, 497–506.
- Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (2000). Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12250–12255.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., and Séguin, C. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310, 207–211.
- Baichwal, V.R., and Sugden, B. (1987). Posttranslational processing of an Epstein-Barr virus-encoded membrane protein expressed in cells transformed by Epstein-Barr virus. *Journal of Virology* 61, 866.
- Baichwal, V.R., and Sugden, B. (1988). Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 2, 461–467.
- Bain, M., Watson, R.J., Farrell, P.J., and Allday, M.J. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a powerful repressor of transcription when tethered to DNA. *J Virol* 70, 2481–2489.
- Bajaj, B.G., Murakami, M., Cai, Q., Verma, S.C., Lan, K., and Robertson, E.S. (2008). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Interacts with and Enhances the Stability of the c-Myc Oncoprotein. *Journal of Virology* 82, 4082–4090.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M., and Draetta, G. (1993). Cyclin D1 Is a Nuclear Protein Required for Cell Cycle Progression in G1. *Genes Dev.* 7, 812–821.
- Banerjee, P., and Chatterjee, M. (2003). Antiproliferative role of vitamin D and its analogs--a brief overview. *Mol. Cell. Biochem.* 253, 247–254.
- Bardwell, V.J., and Treisman, R. (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* 8, 1664–1677.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.
- Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehse, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jaker, C., Hock, J., Meister, G., and Grasser, F.A. (2007). Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Research* 36, 666–675.
- Bashaw, J.M., and Yates, J.L. (2001). Replication from oriP of Epstein-Barr Virus Requires Exact Spacing of Two Bound Dimers of EBNA1 Which Bend DNA. *J Virol* 75, 10603–10611.
- Bastien, N., and McBride, A.A. (2000). Interaction of the Papillomavirus E2 Protein with Mitotic Chromosomes. *Virology* 270, 124–134.
- Basu, S., Liu, Q., Qiu, Y., and Dong, F. (2009). Gfi-1 represses CDKN2B encoding p15INK4B through interaction with Miz-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 1433–1438.

- Batisse, J., Manet, E., Middeldorp, J., Sergeant, A., and Gruffat, H. (2005). Epstein-Barr Virus mRNA Export Factor EB2 Is Essential for Intranuclear Capsid Assembly and Production of gp350. *J Virol* 79, 14102–14111.
- Van Beek, J., Brink, A.A.T.P., Vervoort, M.B.H.J., Van Zijp, M.J.M., Meijer, C.J.L.M., Van Den Brule, A.J.C., and Middeldorp, J.M. (2003). In Vivo Transcription of the Epstein-Barr Virus (EBV) BamHI-A Region Without Associated in Vivo BARF0 Protein Expression in Multiple EBV-Associated Disorders. *J Gen Virol* 84, 2647–2659.
- Beisel, C., Tanner, J., Matsuo, T., Thorley-Lawson, D., Kezdy, F., and Kieff, E. (1985). Two major outer envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus are encoded by the same gene. *J Virol* 54, 665–674.
- Benzeno, Lu, F., Guo, M., Barbash, O., Zhang, F., Herman, J.G., Klein, P.S., Rustgi, A., and Diehl, J.A. (2006). Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. *Oncogene* 25, 6291–6303.
- Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhatar, R., and Shilatifard, A. (2009). An Operational Definition of Epigenetics. *Genes Dev.* 23, 781–783.
- Bernasconi, N.L., Traggiai, E., and Lanzavecchia, A. (2002). Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells. *Science* 298, 2199–2202.
- Billaud, M., Rousset, F., Calender, A., Cordier, M., Aubry, J.P., Laisse, V., and Lenoir, G.M. (1990). Low expression of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 and LFA-3 adhesion molecules is a common trait in Burkitt's lymphoma associated with and not associated with Epstein-Barr virus. *Blood* 75, 1827–1833.
- Birkenbach, M., Liebowitz, D., Wang, F., Sample, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein increases vimentin expression in human B-cell lines. *J Virol* 63, 4079–4084.
- Bochkarev, A., Barwell, J.A., Pfuetzner, R.A., Bochkareva, E., Frappier, L., and Edwards, A.M. (1996). Crystal Structure of the DNA-Binding Domain of the Epstein-Barr Virus Origin-Binding Protein, EBNA1, Bound to DNA. *Cell* 84, 791–800.
- Bochkarev, A., Barwell, J.A., Pfuetzner, R.A., Furey Jr., W., Edwards, A.M., and Frappier, L. (1995). Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein EBNA1. *Cell* 83, 39–46.
- Bodescot, M., Chambrud, B., Farrell, P., and Perricaudet, M. (1984). Spliced RNA from the IR1-U2 region of Epstein-Barr virus: presence of an open reading frame for a repetitive polypeptide. *EMBO J* 3, 1913–1917.
- Bodescot, M., and Perricaudet, M. (1986). Epstein-Barr virus mRNAs produced by alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 14, 7103–7114.
- Bodescot, M., Perricaudet, M., and Farrell, P.J. (1987). A promoter for the highly spliced EBNA family of RNAs of Epstein-Barr virus. *J Virol* 61, 3424–3430.
- Bommer, G.T., Jäger, C., Dürr, E.-M., Baehs, S., Eichhorst, S.T., Brabletz, T., Hu, G., Fröhlich, T., Arnold, G., Kress, D.C., et al. (2005). DRO1, a Gene Down-Regulated by

Oncogenes, Mediates Growth Inhibition in Colon and Pancreatic Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 7962–7975.

Bomsztyk, K., Denisenko, O., and Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: One protein multiple processes. *BioEssays* 26, 629–638.

Bornkamm, G.W. (2009). Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int. J. Cancer* 124, 1745–1755.

Borza, C.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nature Medicine* 8, 594–599.

Borza, C.M., Morgan, A.J., Turk, S.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2004). Use of gHgL for Attachment of Epstein-Barr Virus to Epithelial Cells Compromises Infection. *J. Virol.* 78, 5007–5014.

Bourillot, P.Y., Waltzer, L., Sergeant, A., and Manet, E. (1998). Transcriptional Repression by the Epstein-Barr Virus EBNA3A Protein Tethered to DNA Does Not Require RBP-Jkappa. *J Gen Virol* 79, 363–370.

Boyd, J.M., Subramanian, T., Schaeper, U., La Regina, M., Bayley, S., and Chinnadurai, G. (1993). A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *EMBO J* 12, 469–478.

Brandtzaeg, P., Baekkevold, E.S., Farstad, I.N., Jahnsen, F.L., Johansen, F.-E., Nilsen, E.M., and Yamanaka, T. (1999a). Regional specialization in the mucosal immune system: what happens in the microcompartments? *Immunology Today* 20, 141–151.

Brandtzaeg, P., Farstad, I.N., and Haraldsen, G. (1999b). Regional specialization in the mucosal immune system: primed cells do not always home along the same track. *Immunol. Today* 20, 267–277.

Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, A., Viré, E., Smet, C.D., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., et al. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *The EMBO Journal* 24, 336–346.

Brooks, L., Yao, Q.Y., Rickinson, A.B., and Young, L.S. (1992). Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol* 66, 2689–2697.

Brooks, L.A., Lear, A.L., Young, L.S., and Rickinson, A.B. (1993). Transcripts from the Epstein-Barr virus BamHI A fragment are detectable in all three forms of virus latency. *J Virol* 67, 3182–3190.

Buck, M., Burgess, A., Stirzaker, R., Krauer, K., and Sculley, T. (2006). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A Contains Six Nuclear-Localization Signals. *J Gen Virol* 87, 2879–2884.

Buisson, M., Manet, E., Trescol-Biemont, M.C., Gruffat, H., Durand, B., and Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) early protein EB2 is a posttranscriptional activator expressed under the control of EBV transcription factors EB1 and R. *J. Virol.* 63, 5276–5284.

- Burgess, A., Buck, M., Krauer, K., and Sculley, T. (2006). Nuclear Localization of the Epstein–Barr Virus EBNA3B Protein. *J Gen Virol* 87, 789–793.
- Burgstahler, R., Kempkes, B., Steube, K., and Lipp, M. (1995). Expression of the Chemokine Receptor BLR2/EBI1 Is Specifically Transactivated by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215, 737–743.
- Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., Kieff, E., and Longnecker, R. (1992). An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J Virol* 66, 5161–5167.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* 46, 218–223.
- Burkitt, D. (1962). A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* 194, 232–234.
- Busson, P., McCoy, R., Sadler, R., Gilligan, K., Tursz, T., and Raab-Traub, N. (1992). Consistent transcription of the Epstein-Barr virus LMP2 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 66, 3257–3262.
- Buxton, P., Zhang, X.-M., Walsh, B., Sriratana, A., Schenberg, I., Manickam, E., and Rowe, T. (2003). Identification and characterization of Snapin as a ubiquitously expressed SNARE-binding protein that interacts with SNAP23 in non-neuronal cells. *Biochemical Journal* 375, 433.
- Cahir-McFarland, E.D., Davidson, D.M., Schauer, S.L., Duong, J., and Kieff, E. (2000). NF- κ B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein–Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6055–6060.
- Cai, Q., Guo, Y., Xiao, B., Banerjee, S., Saha, A., Lu, J., Glisovic, T., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Stabilizes Gemin3 to Block p53-mediated Apoptosis. *PLoS Pathog* 7, e1002418.
- Cai, X., Schäfer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., and Cullen, B.R. (2006). Epstein–Barr Virus MicroRNAs Are Evolutionarily Conserved and Differentially Expressed. *PLoS Pathog* 2,.
- Cai, Y., Jin, J., Yao, T., Gottschalk, A.J., Swanson, S.K., Wu, S., Shi, Y., Washburn, M.P., Florens, L., Conaway, R.C., et al. (2007). YY1 functions with INO80 to activate transcription. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 872–874.
- Calderwood, M.A., Lee, S., Holthaus, A.M., Blacklow, S.C., Kieff, E., and Johannsen, E. (2011). Epstein–Barr virus nuclear protein 3C binds to the N-terminal (NTD) and beta trefoil domains (BTD) of RBP/CSL; Only the NTD interaction is essential for lymphoblastoid cell growth. *Virology* 414, 19–25.
- Calderwood, M.A., Venkatesan, K., Xing, L., Chase, M.R., Vazquez, A., Holthaus, A.M., Ewence, A.E., Li, N., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, D.E., et al. (2007). Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 7606–7611.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr Virus LMP2A Drives B Cell Development and Survival in the Absence of Normal B Cell Receptor

Signals. *Immunity* 9, 405–411.

Calender, A., Billaud, M., Aubry, J.P., Banchereau, J., Vuillaume, M., and Lenoir, G.M. (1987). Epstein-Barr virus (EBV) induces expression of B-cell activation markers on in vitro infection of EBV-negative B-lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 8060–8064.

Cambier, J.C., Pleiman, C.M., and Clark, M.R. (1994). Signal Transduction by the B Cell Antigen Receptor and its Coreceptors. *Annual Review of Immunology* 12, 457–486.

Carnero, A., and Hannon, G.J. (1998). The INK4 family of CDK inhibitors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 227, 43–55.

Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nature Immunology* 5, 317–327.

Ceccarelli, D.F.J., and Frappier, L. (2000). Functional Analyses of the EBNA1 Origin DNA Binding Protein of Epstein-Barr Virus. *J Virol* 74, 4939–4948.

Chang, Y., Tung, C.-H., Huang, Y.-T., Lu, J., Chen, J.-Y., and Tsai, C.-H. (1999). Requirement for Cell-to-Cell Contact in Epstein-Barr Virus Infection of Nasopharyngeal Carcinoma Cells and Keratinocytes. *J Virol* 73, 8857–8866.

Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A., and Yates, J.L. (2001). Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10085–10089.

Chavrier, P., Gruffat, H., Chevallier-Greco, A., Buisson, M., and Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) early promoter DR contains a cis-acting element responsive to the EBV transactivator EB1 and an enhancer with constitutive and inducible activities. *J. Virol.* 63, 607–614.

Chen, A., Zhao, B., Kieff, E., Aster, J.C., and Wang, F. (2006). EBNA-3B- and EBNA-3C-Regulated Cellular Genes in Epstein-Barr Virus-Immortalized Lymphoblastoid Cell Lines. *J Virol* 80, 10139–10150.

Chen, H., Lee, J.M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M.H., Ambinder, R.F., and Hayward, S.D. (2001). Linkage between STAT Regulation and Epstein-Barr Virus Gene Expression in Tumors. *Journal of Virology* 75, 2929–2937.

Chen, M.R., Middeldorp, J.M., and Hayward, S.D. (1993). Separation of the complex DNA binding domain of EBNA-1 into DNA recognition and dimerization subdomains of novel structure. *J Virol* 67, 4875–4885.

Chen, M.R., Yang, J.F., Wu, C.W., Middeldorp, J.M., and Chen, J.Y. (1998). Physical association between the EBV protein EBNA-1 and P32/TAP/hyaluronectin. *J. Biomed. Sci.* 5, 173–179.

Chen, M.S., Silverstein, A.M., Pratt, W.B., and Chinkers, M. (1996). The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. *J. Biol. Chem.* 271, 32315–32320.

- Chen, T., Muratore, T.L., Schaner-Tooley, C.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Macara, I.G. (2007). N-terminal α -methylation of RCC1 is necessary for stable chromatin association and normal mitosis. *Nature Cell Biology* 9, 596–603.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J., and Sergeant, A. (1986). Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J* 5, 3243–3249.
- Choudhuri, T., Verma, S.C., Lan, K., Murakami, M., and Robertson, E.S. (2007). The ATM/ATR Signaling Effector Chk2 Is Targeted by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C To Release the G2/M Cell Cycle Block. *Journal of Virology* 81, 6718–6730.
- Choudhuri, T., Verma, S.C., Lan, K., and Robertson, E.S. (2006). Expression of alpha V integrin is modulated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the metastasis suppressor Nm23-H1 through interaction with the GATA-1 and Sp1 transcription factors. *Virology* 351, 58–72.
- Choy, E.Y.-W., Siu, K.-L., Kok, K.-H., Lung, R.W.-M., Tsang, C.M., To, K.-F., Kwong, D.L.-W., Tsao, S.W., and Jin, D.-Y. (2008). An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *Journal of Experimental Medicine* 205, 2551–2560.
- Claassen, G.F., and Hann, S.R. (2000). A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 9498–9503.
- Claret, F.-X., Hibi, M., Dhut, S., Toda, T., and Karin, M. (1996). A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. , Published Online: 03 October 1996; | Doi:10.1038/383453a0 383, 453–457.
- Clarke, P.A., Schwemmle, M., Schickinger, J., Hilse, K., and Clemens, M.J. (1991). Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI. *Nucleic Acids Res* 19, 243–248.
- Clarke, P.R., and Zhang, C. (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 464–477.
- Cludts, I., and Farrell, P.J. (1998). Multiple Functions within the Epstein-Barr Virus EBNA-3A Protein. *J Virol* 72, 1862–1869.
- Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9558–9562.
- Cooper, A., Johannsen, E., Maruo, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Davidson, D., and Kieff, E. (2003). EBNA3A Association with RBP-J κ Down-Regulates c-myc and Epstein-Barr Virus-Transformed Lymphoblast Growth. *J Virol* 77, 999–1010.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G.M. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol* 64, 1002–1013.

- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37.
- Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* 2, 647–656.
- Cotter, M.A., and Robertson, E.S. (2000). Modulation of Histone Acetyltransferase Activity through Interaction of Epstein-Barr Nuclear Antigen 3C with Prothymosin Alpha. *Mol Cell Biol* 20, 5722–5735.
- Countryman, J., and Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4085–4089.
- Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A.L. (1996). Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annual Review of Biochemistry* 65, 801–847.
- Cox, M.A., Leahy, J., and Hardwick, J.M. (1990). An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J Virol* 64, 313–321.
- Cruikshank, J., Shire, K., Davidson, A.R., Edwards, A.M., and Frappier, L. (2000). Two Domains of the Epstein-Barr Virus Origin DNA-Binding Protein, EBNA1, Orchestrate Sequence-Specific DNA Binding. *J. Biol. Chem.* 275, 22273–22277.
- Cullen, B.R. (2006). Viruses and microRNAs. *Nature Genetics* 38, S25–S30.
- D’Apuzzo, M., Rolink, A., Loetscher, M., Hoxie, J.A., Clark-Lewis, I., Melchers, F., Baggiolini, M., and Moser, B. (1997). The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4. *Eur. J. Immunol.* 27, 1788–1793.
- Dalbiès-Tran, R., Stigger-Rosser, E., Dotson, T., and Sample, C.E. (2001). Amino Acids of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A Essential for Repression of J κ -Mediated Transcription and Their Evolutionary Conservation. *J Virol* 75, 90–99.
- Dambaugh, T., Hennessy, K., Chamnankit, L., and Kieff, E. (1984). U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 7632–7636.
- Dang, C.V., O’Donnell, K.A., and Juopperi, T. (2005). The great MYC escape in tumorigenesis. *Cancer Cell* 8, 177–178.
- Datta, A.K., Colby, B.M., Shaw, J.E., and Pagano, J.S. (1980). Acyclovir inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 5163.
- David, G., Neptune, M.A., and DePinho, R.A. (2002). SUMO-1 Modification of Histone Deacetylase 1 (HDAC1) Modulates Its Biological Activities. *J. Biol. Chem.* 277, 23658–23663.
- Dawson, C.W., Dawson, J., Jones, R., Ward, K., and Young, L.S. (1998). Functional

Differences between BHRF1, the Epstein-Barr Virus-Encoded Bcl-2 Homologue, and Bcl-2 in Human Epithelial Cells. *J Virol* 72, 9016–9024.

Deacon, E.M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A.B., and Young, L.S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J. Exp. Med.* 177, 339–349.

Deane, R., Schäfer, W., Zimmermann, H.P., Mueller, L., Görlich, D., Prehn, S., Ponstingl, H., and Bischoff, F.R. (1997). Ran-binding protein 5 (RanBP5) is related to the nuclear transport factor importin-beta but interacts differently with RanBP1. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5087–5096.

DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D.M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275–283.

Deng, Z., Atanasiu, C., Zhao, K., Marmorstein, R., Sbodio, J.I., Chi, N.-W., and Lieberman, P.M. (2005). Inhibition of Epstein-Barr Virus OriP Function by Tankyrase, a Telomere-Associated Poly-ADP Ribose Polymerase That Binds and Modifies EBNA1. *J Virol* 79, 4640–4650.

Dhar, S.K., Yoshida, K., Machida, Y., Khaira, P., Chaudhuri, B., Wohlschlegel, J.A., Leffak, M., Yates, J., and Dutta, A. (2001). Replication from oriP of Epstein-Barr Virus Requires Human ORC and Is Inhibited by Geminin. *Cell* 106, 287–296.

Díaz-Jullien, C., Pérez-Estévez, A., Covelo, G., and Freire, M. (1996). Prothymosin alpha binds histones in vitro and shows activity in nucleosome assembly assay. *Biochim. Biophys. Acta* 1296, 219–227.

Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499–3511.

Dillner, J., Kallin, B., Alexander, H., Ernberg, I., Uno, M., Ono, Y., Klein, G., and Lerner, R.A. (1986). An Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA5) partly encoded by the transformation-associated Bam WYH region of EBV DNA: preferential expression in lymphoblastoid cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6641–6645.

Dolfini, D., Gatta, R., and Mantovani, R. (2012). NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 47, 29–49.

Dotto, G.P. (2000). p21WAF1/Cip1: more than a break to the cell cycle? *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1471, M43–M56.

Douville, J.M., Cheung, D.Y.C., Herbert, K.L., Moffatt, T., and Wigle, J.T. (2011). Mechanisms of MEOX1 and MEOX2 Regulation of the Cyclin Dependent Kinase Inhibitors p21CIP1/WAF1 and p16INK4a in Vascular Endothelial Cells. *PLoS ONE* 6, e29099.

Durick, K., Gill, G.N., and Taylor, S.S. (1998). Shc and Enigma Are Both Required for Mitogenic Signaling by Ret/ptc2. *Molecular and Cellular Biology* 18, 2298.

Dusso, A.S., Brown, A.J., and Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 289, F8–28.

Dyson, N., Howley, P.M., Münger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934–937.

Eilers, M., and Eisenman, R.N. (2008). Myc's broad reach. *Genes & Development* 22, 2755–2766.

el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817–825.

Elend, M., and Eilers, M. (1999). Cell growth: Downstream of Myc – to grow or to cycle? *Current Biology* 9, R936–R938.

Elliott, J., Goodhew, E.B., Krug, L.T., Shakhnovsky, N., Yoo, L., and Speck, S.H. (2004). Variable Methylation of the Epstein-Barr Virus Wp EBNA Gene Promoter in B-Lymphoblastoid Cell Lines. *Journal of Virology* 78, 14062–14065.

Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1, 702–703.

Epstein, M.A., and Barr, Y.M. (1964). Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *The Lancet* 283, 252–253.

Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1965). Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med* 121, 761–770.

Erickson, K.D., Berger, C., Coffin, W.F., Schiff, E., Walling, D.M., and Martin, J.M. (2003). Unexpected Absence of the Epstein-Barr Virus (EBV) lyLMP-1 Open Reading Frame in Tumor Virus Isolates: Lack of Correlation between Met129 Status and EBV Strain Identity. *Journal of Virology* 77, 4415–4422.

Erickson, K.D., and Martin, J.M. (1997). Early Detection of the Lytic LMP-1 Protein in EBV-Infected B-Cells Suggests Its Presence in the Virion. *Virology* 234, 1–13.

Erickson, K.D., and Martin, J.M. (2000). The Late Lytic LMP-1 Protein of Epstein-Barr Virus Can Negatively Regulate LMP-1 Signaling. *J. Virol.* 74, 1057–1060.

Evans, T.J., Farrell, P.J., and Swaminathan, S. (1996). Molecular genetic analysis of Epstein-Barr virus Cp promoter function. *J Virol* 70, 1695–1705.

Faggioni, A., Zompetta, C., Grimaldi, S., Barile, G., Frati, L., and Lazdins, J. (1986). Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells. *Science* 232, 1554–1556.

Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P., and Joab, I. (2000). Transforming Growth Factor Beta 1 Stimulates Expression of the Epstein-Barr Virus BZLF1 Immediate-Early Gene Product ZEBRA by an Indirect Mechanism Which Requires the MAPK Kinase Pathway. *J Virol* 74, 5810–5818.

Fåhræus, R., Fu, H.L., Ernberg, I., Finke, J., Rowe, M., Klein, G., Falk, K., Nilsson, E., Yadav, M., Busson, P., et al. (1988). Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in

nasopharyngeal carcinoma. *International Journal of Cancer* 42, 329–338.

Fåhræus, R., Jansson, A., Ricksten, A., Sjöblom, A., and Rymo, L. (1990). Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter by modulating the activity of a negative regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7390–7394.

Feederle, R., Haar, J., Bernhardt, K., Linnstaedt, S.D., Bannert, H., Lips, H., Cullen, B.R., and Delecluse, H.-J. (2011a). The Members of an Epstein-Barr Virus MicroRNA Cluster Cooperate To Transform B Lymphocytes. *Journal of Virology* 85, 9801–9810.

Feederle, R., Linnstaedt, S.D., Bannert, H., Lips, H., Bencun, M., Cullen, B.R., and Delecluse, H.-J. (2011b). A Viral microRNA Cluster Strongly Potentiates the Transforming Properties of a Human Herpesvirus. *PLoS Pathogens* 7, e1001294.

Fennewald, S., van Santen, V., and Kieff, E. (1984). Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J Virol* 51, 411–419.

Feuillard, J., Schuhmacher, M., Kohanna, S., Asso-Bonnet, M., Ledeur, F., Joubert-Caron, R., Bissières, P., Polack, A., Bornkamm, G.W., and Raphaël, M. (2000). Inducible loss of NF- κ B activity is associated with apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *Blood* 95, 2068–2075.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. , Published Online: 20 July 1989; | Doi:10.1038/340245a0 340, 245–246.

Filardo, E.J., Brooks, P.C., Deming, S.L., Damsky, C., and Cheresch, D.A. (1995). Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. *J. Cell Biol.* 130, 441–450.

Fingerroth, J.D., Diamond, M.E., Sage, D.R., Hayman, J., and Yates, J.L. (1999). CD21-Dependent Infection of an Epithelial Cell Line, 293, by Epstein-Barr Virus. *J Virol* 73, 2115–2125.

Fischer, E., Delibrias, C., and Kazatchkine, M.D. (1991). Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J. Immunol.* 146, 865–869.

Fixman, E.D., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1992). trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol* 66, 5030–5039.

Flavell, K.J., and Murray, P.G. (2000). Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol Pathol* 53, 262–269.

Flemington, E., and Speck, S.H. (1990a). Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol* 64, 1227–1232.

Flemington, E., and Speck, S.H. (1990b). Epstein-Barr virus BZLF1 trans activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos. *J Virol* 64, 4549–4552.

Flemington, E., and Speck, S.H. (1990c). Identification of phorbol ester response elements in

the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol* 64, 1217–1226.

Flemington, E.K., Goldfeld, A.E., and Speck, S.H. (1991). Efficient transcription of the Epstein-Barr virus immediate-early BZLF1 and BRLF1 genes requires protein synthesis. *J Virol* 65, 7073–7077.

Frade, R., Barel, M., Ehlin-Henriksson, B., and Klein, G. (1985). gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1490–1493.

Frappier, L., and O'Donnell, M. (1991). Overproduction, Purification, and Characterization of EBNA1, the Origin Binding Protein of Epstein-Barr Virus. *J. Biol. Chem.* 266, 7819–7826.

Fries, K.L., Miller, W.E., and Raab-Traub, N. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* 70, 8653–8659.

Fruehling, S., and Longnecker, R. (1997). The Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif of Epstein-Barr Virus LMP2A Is Essential for Blocking BCR-Mediated Signal Transduction. *Virology* 235, 241–251.

Fruehling, S., Swart, R., Dolwick, K.M., Kremmer, E., and Longnecker, R. (1998). Tyrosine 112 of Latent Membrane Protein 2A Is Essential for Protein Tyrosine Kinase Loading and Regulation of Epstein-Barr Virus Latency. *J Virol* 72, 7796–7806.

Fuentes-Pananá, E.M., Peng, R., Brewer, G., Tan, J., and Ling, P.D. (2000). Regulation of the Epstein-Barr Virus C Promoter by AUF1 and the Cyclic AMP/Protein Kinase A Signaling Pathway. *J Virol* 74, 8166–8175.

Fugger, K., Mistrik, M., Danielsen, J.R., Dinant, C., Falck, J., Bartek, J., Lukas, J., and Mailand, N. (2009). Human Fbh1 helicase contributes to genome maintenance via pro- and anti-recombinase activities. *The Journal of Cell Biology* 186, 655–663.

Fujiwara, S., and Ono, Y. (1995). Isolation of Epstein-Barr virus-infected clones of the human T-cell line MT-2: use of recombinant viruses with a positive selection marker. *J Virol* 69, 3900–3903.

Fukuda, M., and Longnecker, R. (2005). Epstein-Barr Virus (EBV) Latent Membrane Protein 2A Regulates B-Cell Receptor-Induced Apoptosis and EBV Reactivation Through Tyrosine Phosphorylation. *J. Virol.* 79, 8655–8660.

Gahn, T.A., and Schildkraut, C.L. (1989). The Epstein-Barr virus origin of plasmid replication, oriP, contains both the initiation and termination sites of DNA replication. *Cell* 58, 527–535.

Ganiatsas, S., Dow, R., Thompson, A., Schulman, B., and Germain, D. (2001). A splice variant of Skp2 is retained in the cytoplasm and fails to direct cyclin D1 ubiquitination in the uterine cancer cell line SK-UT. *Oncogene* 20, 3641–3650.

Gansauge, S., Gansauge, F., Ramadani, M., Stobbe, H., Rau, B., Harada, N., and Beger, H.G. (1997). Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Res.* 57, 1634–1637.

Gartel, A.L., and Tyner, A.L. (2002). The Role of the Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21 in Apoptosis 1 Supported in part by NIH Grant R01 DK56283 (to A. L. T.) for the p21 research and Campus Research Board and Illinois Department of Public Health Penny Severns Breast and Cervical Cancer grants (to A. L. G.).1. *Mol Cancer Ther* 1, 639–649.

Gartel, A.L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *PNAS* 98, 4510–4515.

Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsässer, H.-P., and Eilers, M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J Cell Biol* 172, 139–149.

Gerber, P., Whang-Peng, J., and Monroe, J.H. (1969). TRANSFORMATION AND CHROMOSOME CHANGES INDUCED BY EPSTEIN-BARR VIRUS IN NORMAL HUMAN LEUKOCYTE CULTURES. *Proc Natl Acad Sci U S A* 63, 740–747.

Gershburg, E., and Pagano, J.S. (2002). Phosphorylation of the Epstein-Barr Virus (EBV) DNA Polymerase Processivity Factor EA-D by the EBV-Encoded Protein Kinase and Effects of the l-Riboside Benzimidazole 1263W94. *J Virol* 76, 998–1003.

Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G., and Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225–228.

Gilligan, K., Sato, H., Rajadurai, P., Busson, P., Young, L., Rickinson, A., Tursz, T., and Raab-Traub, N. (1990). Novel transcription from the Epstein-Barr virus terminal EcoRI fragment, DIJhet, in a nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Virology* 64, 4948.

Giot, J.F., Mikaelian, I., Buisson, M., Manet, E., Joab, I., Nicolas, J.C., and Sergeant, A. (1991). Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. *Nucleic Acids Res* 19, 1251–1258.

Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* 18, 3064–3073.

Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 16, 6131–6140.

Glickman, J.N., Howe, J.G., and Steitz, J.A. (1988). Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* 62, 902–911.

Golden, T., Swingle, M., and Honkanen, R.E. (2008). The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 27, 169–178.

Gomez-Marquez, J., and Rodríguez, P. (1998). Prothymosin alpha is a chromatin-remodelling protein in mammalian cells. *Biochem J* 333, 1–3.

- Goto, H., Motomura, S., Wilson, A.C., Freiman, R.N., Nakabeppu, Y., Fukushima, K., Fujishima, M., Herr, W., and Nishimoto, T. (1997). A single-point mutation in HCF causes temperature-sensitive cell-cycle arrest and disrupts VP16 function. *Genes Dev.* *11*, 726–737.
- Grässer, F.A., Göttel, S., Haiss, P., Boldyreff, B., Issinger, O.G., and Mueller-Lantzsch, N. (1992). Phosphorylation of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *186*, 1694–1701.
- Grässer, F.A., Haiss, P., Göttel, S., and Mueller-Lantzsch, N. (1991). Biochemical characterization of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A. *J Virol* *65*, 3779–3788.
- Gratama, J.W., Oosterveer, M.A., Zwaan, F.E., Lepoutre, J., Klein, G., and Ernberg, I. (1988). Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 8693–8696.
- Grau, D.J., Chapman, B.A., Garlick, J.D., Borowsky, M., Francis, N.J., and Kingston, R.E. (2011). Compaction of chromatin by diverse Polycomb group proteins requires localized regions of high charge. *Genes Dev.* *25*, 2210–2221.
- Greene, L.M., Campiani, G., Lawler, M., Williams, D.C., and Zisterer, D.M. (2008). BubR1 is required for a sustained mitotic spindle checkpoint arrest in human cancer cells treated with tubulin-targeting pyrrolo-1,5-benzoxazepines. *Mol. Pharmacol.* *73*, 419–430.
- Gregory, C.D., Rowe, M., and Rickinson, A.B. (1990). Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J. Gen. Virol.* *71* (Pt 7), 1481–1495.
- Grossman, S.R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R., and Kieff, E. (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7568–7572.
- Groux, H., Cottrez, F., Montpellier, C., Quatannens, B., Coll, J., Stehelin, D., and Auriault, C. (1997). Isolation and Characterization of Transformed Human T-Cell Lines Infected by Epstein-Barr Virus. *Blood* *89*, 4521–4530.
- Gruffat, H., Batisse, J., Pich, D., Neuhiel, B., Manet, E., Hammerschmidt, W., and Sergeant, A. (2002). Epstein-Barr Virus mRNA Export Factor EB2 Is Essential for Production of Infectious Virus. *J Virol* *76*, 9635–9644.
- Gruffat, H., Duran, N., Buisson, M., Wild, F., Buckland, R., and Sergeant, A. (1992). Characterization of an R-binding site mediating the R-induced activation of the Epstein-Barr virus BMLF1 promoter. *J. Virol.* *66*, 46–52.
- Gruffat, H., Kadjouf, F., Mariamé, B., and Manet, E. (2012). The Epstein-Barr Virus BcRF1 Gene Product Is a TBP-Like Protein with an Essential Role in Late Gene Expression. *J. Virol.*
- Gruffat, H., Moreno, N., and Sergeant, A. (1990). The Epstein-Barr virus (EBV) ORI1yt enhancer is not B-cell specific and does not respond synergistically to the EBV transcription factors R and Z. *J. Virol.* *64*, 2810–2818.
- Gruffat, H., and Sergeant, A. (1994). Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res* *22*, 1172–1178.

- Gruhne, B., Sompallae, R., and Masucci, M.G. (2009). Three Epstein–Barr virus latency proteins independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA repair and inactivating cell cycle checkpoints. *Oncogene* 28, 3997–4008.
- Grundhoff, A.T., Kremmer, E., Türeci, Ö., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Mueller-Lantzsch, N., Schubach, W.H., and Grässer, F.A. (1999). Characterization of DP103, a Novel DEAD Box Protein That Binds to the Epstein-Barr Virus Nuclear Proteins EBNA2 and EBNA3C. *J. Biol. Chem.* 274, 19136–19144.
- Gu, Y.-Z., Hogenesch, J.B., and Bradfield, C.A. (2000). The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40, 519–561.
- Guy, P.M., Kenny, D.A., and Gill, G.N. (1999). The PDZ Domain of the LIM Protein Enigma Binds to β -Tropomyosin. *Mol. Biol. Cell* 10, 1973–1984.
- Haan, K.M., and Longnecker, R. (2000). Coreceptor restriction within the HLA-DQ locus for Epstein–Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9252–9257.
- Hallstrom, T.C. (2006). Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis. *Genes & Development* 20, 613–623.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein–Barr virus in human B lymphocytes. , Published Online: 03 August 1989; | Doi:10.1038/340393a0 340, 393–397.
- Hammerschmidt, W., Sugden, B., and Baichwal, V.R. (1989). The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol* 63, 2469–2475.
- Hampar, B., Tanaka, A., Nonoyama, M., and Derge, J.G. (1974). Replication of the Resident Repressed Epstein-Barr Virus Genome During the Early S Phase (S-1 Period) of Nonproducer Raji Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 631–633.
- Hampsey, M. (1998). Molecular Genetics of the RNA Polymerase II General Transcriptional Machinery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 465.
- Harada, K., and Ogden, G.R. (2000). An overview of the cell cycle arrest protein, p21WAF1. *Oral Oncology* 36, 3–7.
- Harada, S., and Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* 71, 6611–6618.
- Hardwick, J.M., Lieberman, P.M., and Hayward, S.D. (1988). A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J Virol* 62, 2274–2284.
- Harris, A., Young, B.D., and Griffin, B.E. (1985). Random association of Epstein-Barr virus genomes with host cell metaphase chromosomes in Burkitt’s lymphoma-derived cell lines. *J Virol* 56, 328–332.
- Harrison, S., Fisenne, K., and Hearing, J. (1994). Sequence requirements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *J Virol* 68, 1913–1925.

Hart, D.N., Baker, B.W., Inglis, M.J., Nimmo, J.C., Starling, G.C., Deacon, E., Rowe, M., and Beard, M.E. (1992). Epstein-Barr viral DNA in acute large granular lymphocyte (natural killer) leukemic cells. *Blood* 79, 2116–2123.

Hartley, J.L. (2000). DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research* 10, 1788–1795.

Harvey, K.J., and Newport, J. (2003). Metazoan Origin Selection, origin recognition complex chromatin binding is regulated by CDC6 recruitment and ATD hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 278, 48524–48528.

zur Hausen, H., O'Neill, F.J., Freese, U.K., and Hecker, E. (1978). Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature* 272, 373–375.

Hay, R.T. (2005). SUMO: A History of Modification. *Molecular Cell* 18, 1–12.

He, B., Raab-Traub, N., Casali, P., and Cerutti, A. (2003). EBV-Encoded Latent Membrane Protein 1 Cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to Induce T Cell-Independent Ig Heavy Chain Class Switching. *J Immunol* 171, 5215–5224.

Hemann, M.T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J.A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J.L., Tansey, W.P., and Lowe, S.W. (2005). Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436, 807–811.

Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., and Rickinson, A. (1993). Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8479–8483.

Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A. (1991). Induction of bcl-2 expression by epstein-barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65, 1107–1115.

Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D., and Peterson, M.G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* 265, 92–95.

Henle, G., and Henle, W. (1966). Immunofluorescence in Cells Derived from Burkitt's Lymphoma. *J Bacteriol* 91, 1248–1256.

Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G.W., Kirya, B.G., Klein, G., Morrow, R.H., Munube, G.M., Pike, P., et al. (1969). Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 1147–1157.

Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 59, 94.

Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., and Henle, G. (1967). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157, 1064–1065.

- Hennessy, K., Fennewald, S., Hummel, M., Cole, T., and Kieff, E. (1984). A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 7207–7211.
- Hennessy, K., Heller, M., van Santen, V., and Kieff, E. (1983). Simple repeat array in Epstein-Barr virus DNA encodes part of the Epstein-Barr nuclear antigen. *Science* *220*, 1396–1398.
- Hennessy, K., Wang, F., Bushman, E.W., and Kieff, E. (1986). Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 5693–5697.
- Herkert, B., and Eilers, M. (2010). Transcriptional Repression. *Genes Cancer* *1*, 580–586.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaoja, J., Saluz, H.-P., Haenel, F., and Eilers, M. (2002). Negative Regulation of the Mammalian UV Response by Myc through Association with Miz-1. *Molecular Cell* *10*, 509–521.
- Hertle, M.L., Popp, C., Petermann, S., Maier, S., Kremmer, E., Lang, R., Mages, J., and Kempkes, B. (2009). Differential Gene Expression Patterns of EBV Infected EBNA-3A Positive and Negative Human B Lymphocytes. *PLoS Pathog* *5*,.
- Hickabottom, M., Parker, G.A., Freemont, P., Crook, T., and Allday, M.J. (2002). Two Nonconsensus Sites in the Epstein-Barr Virus Oncoprotein EBNA3A Cooperate to Bind the Co-Repressor Carboxyl-Terminal-Binding Protein (CtBP). *J. Biol. Chem.* *277*, 47197–47204.
- Higgins, C.D., Swerdlow, A.J., Macsween, K.F., Harrison, N., Williams, H., McAulay, K., Thomas, R., Reid, S., Conacher, M., Britton, K., et al. (2007). A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J. Infect. Dis.* *195*, 474–482.
- Higuchi, M., Kieff, E., and Izumi, K.M. (2002). The Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Putative Janus Kinase 3 (JAK3) Binding Domain Does Not Mediate JAK3 Association or Activation in B-Lymphoma or Lymphoblastoid Cell Lines. *J. Virol.* *76*, 455–459.
- Hislop, A.D., Taylor, G.S., Sauce, D., and Rickinson, A.B. (2007). Cellular Responses to Viral Infection in Humans: Lessons from Epstein-Barr Virus. *Annual Review of Immunology* *25*, 587–617.
- Hitakomate, E., Hood, F.E., Sanderson, H.S., and Clarke, P.R. (2010). The methylated N-terminal tail of RCC1 is required for stabilisation of its interaction with chromatin by Ran in live cells. *BMC Cell Biology* *11*, 43.
- Hitt, M.M., Allday, M.J., Hara, T., Karran, L., Jones, M.D., Busson, P., Tursz, T., Ernberg, I., and Griffin, B.E. (1989). EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J* *8*, 2639–2651.
- Hochberg, D., Middeldorp, J.M., Catalina, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., and Thorley-Lawson, D.A. (2004). Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 239–244.

- Höfelmayr, H., Strobl, L.J., Marschall, G., Bornkamm, G.W., and Zimmer-Strobl, U. (2001). Activated Notch1 Can Transiently Substitute for EBNA2 in the Maintenance of Proliferation of LMP1-Expressing Immortalized B Cells. *J Virol* 75, 2033–2040.
- Höfelmayr, H., Strobl, L.J., Stein, C., Laux, G., Marschall, G., Bornkamm, G.W., and Zimmer-Strobl, U. (1999). Activated Mouse Notch1 Transactivates Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2-Regulated Viral Promoters. *J Virol* 73, 2770–2780.
- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavölgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., and Falk, K.I. (1999). Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93, 3956–3963.
- Holowaty, M.N., Zeghouf, M., Wu, H., Tellam, J., Athanasopoulos, V., Greenblatt, J., and Frappier, L. (2003). Protein Profiling with Epstein-Barr Nuclear Antigen-1 Reveals an Interaction with the Herpesvirus-Associated Ubiquitin-Specific Protease HAUSP/USP7. *J. Biol. Chem.* 278, 29987–29994.
- Hopwood, P. (2000). The role of EBV in post-transplant malignancies: a review. *Journal of Clinical Pathology* 53, 248–254.
- Howe, J.G., and Shu, M.D. (1988). Isolation and characterization of the genes for two small RNAs of herpesvirus papio and their comparison with Epstein-Barr virus-encoded EBER RNAs. *J Virol* 62, 2790–2798.
- Hsieh, J.J., and Hayward, S.D. (1995). Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560–563.
- Hsieh, J.J.-D., Zhou, S., Chen, L., Young, D.B., and Hayward, S.D. (1999). CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 23–28.
- Hsu, C.-C., Lee, Y.-C., Yeh, S.-H., Chen, C.-H., Wu, C.-C., Wang, T.-Y., Chen, Y.-N., Hung, L.-Y., Liu, Y.-W., Chen, H.-K., et al. (2012). The 58-kDa microspherule protein (MSP58) is a novel brahma-related gene 1 (BRG1)-associated protein that modulates the p53-p21 senescence pathway. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Hsueh, K.-W., Fu, S.-L., Huang, C.-Y.F., and Lin, C.-H. (2011). Aurora-A phosphorylates hnRNPK and disrupts its interaction with p53. *FEBS Letters* 585, 2671–2675.
- Huang, G., and Elferink, C.J. (2005). Multiple Mechanisms Are Involved in Ah Receptor-Mediated Cell Cycle Arrest. *Mol Pharmacol* 67, 88–96.
- Huang, H., Pan, X.H., Zhou, J.H., Yu, L., Kong, X.T., Zhou, S.M., Li, Z.J., Fu, Q., and Sun, X.Y. (1998). The effect of Epstein-Barr virus gene BHRF1 expression on radioresistance of nasopharyngeal carcinoma cells. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 60, 329–333.
- Hudson, G.S., Farrell, P.J., and Barrell, B.G. (1985). Two related but differentially expressed potential membrane proteins encoded by the EcoRI Dhet region of Epstein-Barr virus B95-8. *Journal of Virology* 53, 528.
- Hughes, R., Kristiansen, M., Lassot, I., Desagher, S., Mantovani, R., and Ham, J. (2010). NF-Y is essential for expression of the proapoptotic bim gene in sympathetic neurons. *Cell Death and Differentiation* 18, 937–947.

- Hummel, M., and Kieff, E. (1982). Mapping of polypeptides encoded by the Epstein-Barr virus genome in productive infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 5698–5702.
- Hummel, M., Thorley-Lawson, D., and Kieff, E. (1984). An Epstein-Barr virus DNA fragment encodes messages for the two major envelope glycoproteins (gp350/300 and gp220/200). *J Virol* *49*, 413–417.
- Hung, S.C., Kang, M.-S., and Kieff, E. (2001). Maintenance of Epstein–Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 1865–1870.
- Hurley, E.A., Agger, S., McNeil, J.A., Lawrence, J.B., Calendar, A., Lenoir, G., and Thorley-Lawson, D.A. (1991). When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J Virol* *65*, 1245–1254.
- Hutchings, I.A., Tierney, R.J., Kelly, G.L., Stylianou, J., Rickinson, A.B., and Bell, A.I. (2006). Methylation Status of the Epstein-Barr Virus (EBV) BamHI W Latent Cycle Promoter and Promoter Activity: Analysis with Novel EBV-Positive Burkitt and Lymphoblastoid Cell Lines. *Journal of Virology* *80*, 10700–10711.
- Hutt-Fletcher, L.M. (2007). Epstein-Barr Virus Entry. *J. Virol.* *81*, 7825–7832.
- Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L.C., and Longnecker, R. (2000). The Epstein–Barr Virus Latent Membrane Protein 2A PY Motif Recruits WW Domain-Containing Ubiquitin-Protein Ligases. *Virology* *268*, 178–191.
- Imai, S., Nishikawa, J., and Takada, K. (1998). Cell-to-Cell Contact as an Efficient Mode of Epstein-Barr Virus Infection of Diverse Human Epithelial Cells. *J Virol* *72*, 4371–4378.
- Ivanova, A.V., Ivanov, S.V., and Lerman, M.L. (2005). Association, mutual stabilization, and transcriptional activity of the STRA13 and MSP58 proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* *62*, 471–484.
- Iwakiri, D., Eizuru, Y., Tokunaga, M., and Takada, K. (2003). Autocrine Growth of Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Carcinoma Cells Mediated by an Epstein-Barr Virus-Encoded Small RNA. *Cancer Res* *63*, 7062–7067.
- Jankelevich, S., Kolman, J.L., Bodnar, J.W., and Miller, G. (1992). A nuclear matrix attachment region organizes the Epstein-Barr viral plasmid in Raji cells into a single DNA domain. *EMBO J* *11*, 1165–1176.
- Jiménez-Ramírez, C., Brooks, A.J., Forshell, L.P., Yakimchuk, K., Zhao, B., Fulgham, T.Z., and Sample, C.E. (2006). Epstein-Barr Virus EBNA-3C Is Targeted to and Regulates Expression from the Bidirectional LMP-1/2B Promoter. *J Virol* *80*, 11200–11208.
- Jin, J., Cai, Y., Yao, T., Gottschalk, A.J., Florens, L., Swanson, S.K., Gutiérrez, J.L., Coleman, M.K., Workman, J.L., Mushegian, A., et al. (2005). A Mammalian Chromatin Remodeling Complex with Similarities to the Yeast INO80 Complex. *J. Biol. Chem.* *280*, 41207–41212.
- Jin, J., and Harper, J.W. (2003). A license to kill: transcriptional activation and enhanced

turnover of Myc by the SCF(kp2) ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 3, 517–518.

Jin, X.W., and Speck, S.H. (1992). Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter. *J Virol* 66, 2846–2852.

Joab, I., Rowe, D.T., Bodescot, M., Nicolas, J.C., Farrell, P.J., and Perricaudet, M. (1987). Mapping of the gene coding for Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen EBNA3 and its transient overexpression in a human cell line by using an adenovirus expression vector. *J Virol* 61, 3340–3344.

Jochner, N., Eick, D., Zimmer-Strobl, U., Pawlita, M., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 15, 375–382.

Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E., and Grossman, S.R. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol* 69, 253–262.

Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M.R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D., and Kieff, E. (2004). Proteins of Purified Epstein-Barr Virus. *PNAS* 101, 16286–16291.

Johannsen, E., Miller, C.L., Grossman, S.R., and Kieff, E. (1996). EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J Virol* 70, 4179–4183.

Johnson, B.D., Schumacher, R.J., Ross, E.D., and Toft, D.O. (1998). Hop Modulates Hsp70/Hsp90 Interactions in Protein Folding. *J. Biol. Chem.* 273, 3679–3686.

Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., and Nevins, J.R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365, 349–352.

Joncas, J., Boucher, J., Granger-Julien, M., and Filion, C. (1974). Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *Canadian Medical Association Journal* 110, 33.

Jones, C.H., Hayward, S.D., and Rawlins, D.R. (1989). Interaction of the lymphocyte-derived Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1 with its DNA-binding sites. *J Virol* 63, 101–110.

Joseph, A.M., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (2000a). Cells Expressing the Epstein-Barr Virus Growth Program Are Present in and Restricted to the Naive B-Cell Subset of Healthy Tonsils. *J Virol* 74, 9964–9971.

Joseph, A.M., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (2000b). EBV Persistence Involves Strict Selection of Latently Infected B Cells. *J Immunol* 165, 2975–2981.

Jourdan, N., Jobart-Malfait, A., Reis, G.D., Quignon, F., Piolot, T., Klein, C., Tramier, M., Coppey-Moisand, M., and Marechal, V. (2012). Live-Cell Imaging Reveals Multiple Interactions between Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 and Cellular Chromatin during Interphase and Mitosis. *J. Virol.* 86, 5314–5329.

Juillard, F., Bazot, Q., Mure, F., Tafforeau, L., Macri, C., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., Manet, E., and Gruffat, H. (2012). Epstein-Barr Virus Protein EB2 Stimulates Cytoplasmic mRNA Accumulation by Counteracting the Deleterious Effects of SRp20 on Viral mRNAs. *Nucl. Acids Res.*

Juillard, F., Hiriart, E., Sergeant, N., Vingtdeux-Didier, V., Drobecq, H., Sergeant, A., Manet, E., and Gruffat, H. (2009). Epstein-Barr Virus Protein EB2 Contains an N-Terminal Transferable Nuclear Export Signal That Promotes Nucleocytoplasmic Export by Directly Binding TAP/NXF1. *J. Virol.* 83, 12759–12768.

Julien, M.D., Polonskaya, Z., and Hearing, J. (2004). Protein and sequence requirements for the recruitment of the human origin recognition complex to the latent cycle origin of DNA replication of Epstein-Barr virus oriP. *Virology* 326, 317–328.

Jung, C.-R., Lim, J.H., Choi, Y., Kim, D.-G., Kang, K.J., Noh, S.-M., and Im, D.-S. (2010). Enigma negatively regulates p53 through MDM2 and promotes tumor cell survival in mice. *Journal of Clinical Investigation* 120, 4493–4506.

Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1999). The Proto-Oncogene c-myc Is a Direct Target Gene of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2. *J Virol* 73, 4481–4484.

Kanda, T., Kamiya, M., Maruo, S., Iwakiri, D., and Takada, K. (2007). Symmetrical Localization of Extrachromosomally Replicating Viral Genomes on Sister Chromatids. *J Cell Sci* 120, 1529–1539.

Kanda, T., Otter, M., and Wahl, G.M. (2001). Coupling of Mitotic Chromosome Tethering and Replication Competence in Epstein-Barr Virus-Based Plasmids. *Mol Cell Biol* 21, 3576–3588.

Kanegane, H., Wado, T., Nunogami, K., Seki, H., Taniguchi, N., and Tosato, G. (1996). Chronic persistent Epstein-Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocytes expansion. *Br. J. Haematol.* 95, 116–122.

Kaneko, T., Fukuda, J., Yoshihara, T., Zheng, H., Mori, S., Mizoguchi, H., and Oshimi, K. (1995). Nasal natural killer (NK) cell lymphoma: report of a case with activated NK cells containing Epstein-Barr virus and expressing CD21 antigen, and comparative studies of their phenotype and cytotoxicity with normal NK cells. *British Journal of Haematology* 91, 355–361.

Kang, Y., Cheong, H.-M., Lee, J.-H., Song, P.I., Lee, K.-H., Kim, S.-Y., Jun, J.Y., and You, H.J. (2011). Protein phosphatase 5 is necessary for ATR-mediated DNA repair. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404, 476–481.

Kao, H.-Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M., and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 12, 2269–2277.

Kapoor, P., and Frappier, L. (2003). EBNA1 Partitions Epstein-Barr Virus Plasmids in Yeast Cells by Attaching to Human EBNA1-Binding Protein 2 on Mitotic Chromosomes. *J Virol* 77, 6946–6956.

- Kapoor, P., Lavoie, B.D., and Frappier, L. (2005). EBP2 Plays a Key Role in Epstein-Barr Virus Mitotic Segregation and Is Regulated by Aurora Family Kinases. *Mol Cell Biol* 25, 4934–4945.
- Kapoor, P., Shire, K., and Frappier, L. (2001). Reconstitution of Epstein-Barr virus-based plasmid partitioning in budding yeast. *EMBO J* 20, 222–230.
- Karran, L., Gao, Y., Smith, P.R., and Griffin, B.E. (1992). Expression of a family of complementary-strand transcripts in Epstein-Barr virus-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8058.
- Kasahara, Y., and Yachie, A. (2002). Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 44, 283–294.
- Kashuba, E., Kashuba, V., Pokrovskaja, K., Klein, G., and Szekely, L. (2000). Epstein-Barr virus encoded nuclear protein EBNA-3 binds XAP-2, a protein associated with Hepatitis B virus X antigen. *Oncogene* 19, 1801–1806.
- Kashuba, E., Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Protopopova, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G., and Szekely, L. (2003). EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *International Journal of Cancer* 105, 644–653.
- Kashuba, E., Yurchenko, M., Yenamandra, S.P., Snopok, B., Isaguliants, M., Szekely, L., and Klein, G. (2008). EBV-Encoded EBNA-6 Binds and Targets MRS18-2 to the Nucleus, Resulting in the Disruption of pRb-E2F1 Complexes. *PNAS* 105, 5489–5494.
- Kashuba, E., Yurchenko, M., Yenamandra, S.P., Snopok, B., Szekely, L., Bercovich, B., Ciechanover, A., and Klein, G. (2011). Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 forms trimolecular protein complexes with MDM2 and p53 and inhibits the transactivating function of p53. *International Journal of Cancer* 128, 817–825.
- Kashuba, E.V., Gradin, K., Isaguliants, M., Szekely, L., Poellinger, L., Klein, G., and Kazlauskas, A. (2006). Regulation of Transactivation Function of the Aryl Hydrocarbon Receptor by the Epstein-Barr Virus-Encoded EBNA-3 Protein. *J. Biol. Chem.* 281, 1215–1223.
- Kato, K., Yokoyama, A., Tohya, Y., Akashi, H., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y. (2003). Identification of Protein Kinases Responsible for Phosphorylation of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein at Serine-35, Which Regulates Its Coactivator Function. *J Gen Virol* 84, 3381–3392.
- Katsanis, N., and Fisher, E.M.C. (1998). A Novel C-Terminal Binding Protein (CTBP2) Is Closely Related to CTBP1, an Adenovirus E1A-Binding Protein, and Maps to Human Chromosome 21q21.3. *Genomics* 47, 294–299.
- Kaul, R., Verma, S.C., Murakami, M., Lan, K., Choudhuri, T., and Robertson, E.S. (2006). Epstein-Barr Virus Protein Can Upregulate Cyclo-Oxygenase-2 Expression through Association with the Suppressor of Metastasis Nm23-H1. *J Virol* 80, 1321–1331.
- Kawa-Ha, K., Ishihara, S., Ninomiya, T., Yumura-Yagi, K., Hara, J., Murayama, F., Tawa,

- A., and Hirai, K. (1989). CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. *J Clin Invest* 84, 51–55.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9150–9154.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., Mosialos, G., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* 69, 675–683.
- Kaykas, A., and Sugden, B. (2000). The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene* 19, 1400–1410.
- Kazlauskas, A., Sundstrom, S., Poellinger, L., and Pongratz, I. (2001). The hsp90 Chaperone Complex Regulates Intracellular Localization of the Dioxin Receptor. *Molecular and Cellular Biology* 21, 2594–2607.
- Kelly, G., Bell, A., and Rickinson, A. (2002). Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nature Medicine* 8, 1098–1104.
- Kelly, G.L., Long, H.M., Stylianou, J., Thomas, W.A., Leese, A., Bell, A.I., Bornkamm, G.W., Mautner, J., Rickinson, A.B., and Rowe, M. (2009). An Epstein-Barr Virus Anti-Apoptotic Protein Constitutively Expressed in Transformed Cells and Implicated in Burkitt Lymphomagenesis: The Wp/BHRF1 Link. *PLoS Pathog* 5, e1000341.
- Kelly, G.L., Milner, A.E., Tierney, R.J., Croom-Carter, D.S.G., Altmann, M., Hammerschmidt, W., Bell, A.I., and Rickinson, A.B. (2005). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 (EBNA2) Gene Deletion Is Consistently Linked with EBNA3A, -3B, and -3C Expression in Burkitt's Lymphoma Cells and with Increased Resistance to Apoptosis. *Journal of Virology* 79, 10709–10717.
- Kennedy, G., and Sugden, B. (2003). EBNA-1, a Bifunctional Transcriptional Activator. *Mol Cell Biol* 23, 6901–6908.
- Kenney, S., Kamine, J., Holley-Guthrie, E., Lin, J.C., Mar, E.C., and Pagano, J. (1989). The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *J Virol* 63, 1729–1736.
- Kerdiles, B., Walls, D., Triki, H., Perricaudet, M., and Joab, I. (1990). cDNA cloning and transient expression of the Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen EBNA3B in human cells and identification of novel transcripts from its coding region. *J Virol* 64, 1812–1816.
- Khan, G., Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (1996). Is EBV Persistence In Vivo a Model for B Cell Homeostasis? *Immunity* 5, 173–179.
- Khanna, R., Burrows, S.R., Kurilla, M.G., Jacob, C.A., Misko, I.S., Sculley, T.B., Kieff, E., and Moss, D.J. (1992). Localization of Epstein-Barr Virus Cytotoxic T Cell Epitopes Using Recombinant Vaccinia: Implications for Vaccine Development. *J Exp Med* 176, 169–176.

- Khanna, R., Moss, D.J., and Burrows, S.R. (1999). Vaccine strategies against Epstein-Barr virus-associated diseases: lessons from studies on cytotoxic T-cell-mediated immune regulation. *Immunol. Rev.* 170, 49–64.
- Kienzle, N., Young, D., Silins, S.L., and Sculley, T.B. (1996). Induction of Pleckstrin by the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3 Family. *Virology* 224, 167–174.
- Kieser, A., Kaiser, C., and Hammerschmidt, W. (1999). LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J* 18, 2511–2521.
- Kilger, E. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *The EMBO Journal* 17, 1700–1709.
- Kim, J., Kim, J.-H., Lee, S.-H., Kim, D.-H., Kang, H.-Y., Bae, S.-H., Pan, Z.-Q., and Seo, Y.-S. (2002). The Novel Human DNA Helicase hFBH1 Is an F-Box Protein. *J. Biol. Chem.* 277, 24530–24537.
- Kim, J.-H. (2004). SCF^{hFBH1} can act as helicase and E3 ubiquitin ligase. *Nucleic Acids Research* 32, 2287–2297.
- Kim, O.J., and Yates, J.L. (1993). Mutants of Epstein-Barr virus with a selective marker disrupting the TP gene transform B cells and replicate normally in culture. *J Virol* 67, 7634–7640.
- Kim, S.Y., Herbst, A., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E., and Tansey, W.P. (2003). Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol. Cell* 11, 1177–1188.
- Kime, L., and Wright, S.C. (2003). Mad4 is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. *Biochemical Journal* 370, 291.
- Kirchmaier, A.L., and Sugden, B. (1997). Dominant-negative inhibitors of EBNA-1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* 71, 1766–1775.
- Kitagawa, M., Higashi, H., Suzuki-Takahashi, I., Segawa, K., Hanks, S.K., Taya, Y., Nishimura, S., and Okuyama, A. (1995). Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene* 10, 229–236.
- Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., et al. (2000). Epstein-Barr virus-encoded poly(A)⁺ RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J* 19, 6742–6750.
- Kitay, M.K., and Rowe, D.T. (1996). Cell cycle stage-specific phosphorylation of the Epstein-Barr virus immortalization protein EBNA-LP. *J Virol* 70, 7885–7893.
- Klein, U., Klein, G., Ehlin-Henriksson, B., Rajewsky, K., and Köhler, R. (1995). Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Molecular Medicine* 1, 495.
- Knight, J.S., Lan, K., Subramanian, C., and Robertson, E.S. (2003). Epstein-Barr Virus

- Nuclear Antigen 3C Recruits Histone Deacetylase Activity and Associates with the Corepressors mSin3A and NCoR in Human B-Cell Lines. *J Virol* 77, 4261–4272.
- Knight, J.S., and Robertson, E.S. (2004). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Regulates Cyclin A/p27 Complexes and Enhances Cyclin A-Dependent Kinase Activity. *Journal of Virology* 78, 1981–1991.
- Knight, J.S., Sharma, N., Kalman, D.E., and Robertson, E.S. (2004). A Cyclin-Binding Motif within the Amino-Terminal Homology Domain of EBNA3C Binds Cyclin A and Modulates Cyclin A-Dependent Kinase Activity in Epstein-Barr Virus-Infected Cells. *Journal of Virology* 78, 12857–12867.
- Knight, J.S., Sharma, N., and Robertson, E.S. (2005a). Epstein-Barr Virus Latent Antigen 3C Can Mediate the Degradation of the Retinoblastoma Protein Through an SCF Cellular Ubiquitin Ligase. *PNAS* 102, 18562–18566.
- Knight, J.S., Sharma, N., and Robertson, E.S. (2005b). SCFSkp2 Complex Targeted by Epstein-Barr Virus Essential Nuclear Antigen. *Molecular and Cellular Biology* 25, 1749–1763.
- Knutson, J.C. (1990). The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol* 64, 2530–2536.
- Ko, L.J., and Prives, C. (1996). P53: Puzzle and Paradigm. *Genes Dev.* 10, 1054–1072.
- Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2000). Ikaros Interactions with CtBP Reveal a Repression Mechanism That Is Independent of Histone Deacetylase Activity. *J. Biol. Chem.* 275, 19594–19602.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., and Takada, K. (1999). Oncogenic Role of Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs in Burkitt's Lymphoma Cell Line Akata. *J Virol* 73, 9827–9831.
- Koons, M.D., Van Scoy, S., and Hearing, J. (2001). The Replicator of the Epstein-Barr Virus Latent Cycle Origin of DNA Replication, oriP, Is Composed of Multiple Functional Elements. *J Virol* 75, 10582–10592.
- Kosan, C., Saba, I., Godmann, M., Herold, S., Herkert, B., Eilers, M., and Mörröy, T. (2010). Transcription Factor Miz-1 Is Required to Regulate Interleukin-7 Receptor Signaling at Early Commitment Stages of B Cell Differentiation. *Immunity* 33, 917–928.
- Kovall, R.A., and Hendrickson, W.A. (2004). Crystal structure of the nuclear effector of Notch signaling, CSL, bound to DNA. *EMBO J* 23, 3441–3451.
- Krauer, K., Buck, M., Flanagan, J., Belzer, D., and Sculley, T. (2004a). Identification of the Nuclear Localization Signals Within the Epstein-Barr Virus EBNA-6 Protein. *J Gen Virol* 85, 165–172.
- Krauer, K.G., Buck, M., Belzer, D.K., Flanagan, J., Chojnowski, G.M., and Sculley, T.B. (2004b). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-6 protein co-localizes with EBNA-3 and survival of motor neurons protein. *Virology* 318, 280–294.

- Krauer, K.G., Burgess, A., Buck, M., Flanagan, J., Sculley, T.B., and Gabrielli, B. (2003). The EBNA-3 gene family proteins disrupt the G2/M checkpoint. *Oncogene* 23, 1342–1353.
- Krauer, K.G., Kienzle, N., Young, D.B., and Sculley, T.B. (1996). Epstein–Barr Nuclear Antigen-3 and -4 Interact with RBP-2N, a Major Isoform of RBP-J κ in B Lymphocytes. *Virology* 226, 346–353.
- Krysan, P.J., Haase, S.B., and Calos, M.P. (1989). Isolation of human sequences that replicate autonomously in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1026–1033.
- Ku, M., Koche, R.P., Rheinbay, E., Mendenhall, E.M., Endoh, M., Mikkelsen, T.S., Presser, A., Nusbaum, C., Xie, X., Chi, A.S., et al. (2008). Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* 4, e1000242.
- Kulukian, A., Han, J.S., and Cleveland, D.W. (2009). Unattached Kinetochores Catalyze Production of an Anaphase Inhibitor that Requires a Mad2 Template to Prime Cdc20 for BubR1 Binding. *Developmental Cell* 16, 105–117.
- Kuppers, D.A., Lan, K., Knight, J.S., and Robertson, E.S. (2005). Regulation of Matrix Metalloproteinase 9 Expression by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C and the Suppressor of Metastasis Nm23-H1. *J Virol* 79, 9714–9724.
- Küppers, R., and Rajewsky, K. (1998). The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 471–493.
- Kwiatkowski, B., Chen, S.Y.J., and Schubach, W.H. (2004). CKII Site in Epstein-Barr Virus Nuclear Protein 2 Controls Binding to hSNF5/Ini1 and Is Important for Growth Transformation. *J. Virol.* 78, 6067–6072.
- Lacombe, M.L., Milon, L., Munier, A., Mehus, J.G., and Lambeth, D.O. (2000). The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 247–258.
- Laherty, C.D., Hu, H.M., Opipari, A.W., Wang, F., and Dixit, V.M. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J. Biol. Chem.* 267, 24157–24160.
- Laichalk, L.L., and Thorley-Lawson, D.A. (2004). Terminal Differentiation into Plasma Cells Initiates the Replicative Cycle of Epstein-Barr Virus In Vivo. *Journal of Virology* 79, 1296–1307.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., and McKnight, S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759–1764.
- Lange, T. de (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 323–329.
- Larcher, C., Kempkes, B., Kremmer, E., Prodinger, W.M., Pawlita, M., Bornkamm, G.W., and Dierich, M.P. (1995). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-2 (EBNA2) induces CD21/CR2 on B and T cell lines and shedding of soluble CD21. *Eur. J. Immunol.* 25, 1713–1719.

- Larochelle, B., Flamand, L., Gourde, P., Beauchamp, D., and Gosselin, J. (1998). Epstein-Barr Virus Infects and Induces Apoptosis in Human Neutrophils. *Blood* 92, 291–299.
- Laux, G., Adam, B., Strobl, L.J., and Moreau-Gachelin, F. (1994a). The Spi-1/PU.1 and Spi-B ets family transcription factors and the recombination signal binding protein RBP-J kappa interact with an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 responsive cis-element. *EMBO J* 13, 5624–5632.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U., and Bornkamm, G.W. (1994b). Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol* 68, 6947–6958.
- Laux, G., Economou, A., and Farrell, P.J. (1989). The Terminal Protein Gene 2 of Epstein-Barr Virus Is Transcribed from a Bidirectional Latent Promoter Region. *J Gen Virol* 70, 3079–3084.
- Laux, G., Perricaudet, M., and Farrell, P.J. (1988). A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *EMBO J* 7, 769–774.
- Lee, J.M., Lee, K.-H., Weidner, M., Osborne, B.A., and Hayward, S.D. (2002). Epstein-Barr virus EBNA2 blocks Nur77- mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11878–11883.
- Lee, K.M., Choi, W.I., Koh, D.I., Kim, Y.J., Jeon, B.N., Yoon, J.H., Lee, C.E., Kim, S.H., Oh, J., and Hur, M.W. (2011). The proto-oncoprotein KR-POK represses transcriptional activation of CDKN1A by MIZ-1 through competitive binding. *Oncogene* 31, 1442–1458.
- Lee, M.-A., Diamond, M.E., and Yates, J.L. (1999). Genetic Evidence that EBNA-1 Is Needed for Efficient, Stable Latent Infection by Epstein-Barr Virus. *J Virol* 73, 2974–2982.
- Lee, S., Sakakibara, S., Maruo, S., Zhao, B., Calderwood, M.A., Holthaus, A.M., Lai, C.-Y., Takada, K., Kieff, E., and Johannsen, E. (2009). Epstein-Barr Virus Nuclear Protein 3C Domains Necessary for Lymphoblastoid Cell Growth: Interaction with RBP-Jk Regulates TCL1. *J Virol* 83, 12368–12377.
- Lee, S.P., Brooks, J.M., Al-Jarrah, H., Thomas, W.A., Haigh, T.A., Taylor, G.S., Humme, S., Schepers, A., Hammerschmidt, W., Yates, J.L., et al. (2004). CD8 T Cell Recognition of Endogenously Expressed Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1. *J Exp Med* 199, 1409–1420.
- Lefkowitz, R.J., and Whalen, E.J. (2004). β -arrestins: traffic cops of cell signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 162–168.
- Legrain, P., and Selig, L. (2000). Genome-wide protein interaction maps using two-hybrid systems. *FEBS Letters* 480, 32–36.
- Lehman, C.W., and Botchan, M.R. (1998). Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4338.
- von der Lehr, N., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydbring, P.,

- Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K.I., et al. (2003). The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol. Cell* 11, 1189–1200.
- Lerner, M.R., Andrews, N.C., Miller, G., and Steitz, J.A. (1981). Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 805–809.
- Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., and Masucci, M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. , Published Online: 22 June 1995; | Doi:10.1038/375685a0 375, 685–688.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12616–12621.
- Li, H., Kolluri, S.K., Gu, J., Dawson, M.I., Cao, X., Hobbs, P.D., Lin, B., Chen, G., Lu, J., Lin, F., et al. (2000). Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3. *Science* 289, 1159–1164.
- Li, H.-Y., and Zheng, Y. (2004). Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells. *Genes Dev.* 18, 512–527.
- Li, R., and Hayward, S.D. (2011). The Ying-Yang of the virus-host interaction: Control of the DNA damage response. *Future Microbiol* 6, 379–383.
- Lieberman, P.M., and Berk, A.J. (1990). In vitro transcriptional activation, dimerization, and DNA-binding specificity of the Epstein-Barr virus Zta protein. *J Virol* 64, 2560–2568.
- Liebowitz, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J., and Kieff, E. (1987). An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol Cell Biol* 7, 2299–2308.
- Liebowitz, D., Wang, D., and Kieff, E. (1986). Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol* 58, 233–237.
- Lim, S., Lee, H.Y., and Lee, H. (1998). Inhibition of colonization and cell-matrix adhesion after nm23-H1 transfection of human prostate carcinoma cells. *Cancer Lett.* 133, 143–149.
- Lin, D.-Y., and Shih, H.-M. (2002). Essential role of the 58-kDa microspherule protein in the modulation of Daxx-dependent transcriptional repression as revealed by nucleolar sequestration. *J. Biol. Chem.* 277, 25446–25456.
- Lin, D.I., Barbash, O., Kumar, K.G.S., Weber, J.D., Harper, J.W., Klein-Szanto, A.J.P., Rustgi, A., Fuchs, S.Y., and Diehl, J.A. (2006). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4- α B crystallin) complex. *Mol. Cell* 24, 355–366.
- Lin, J., Johannsen, E., Robertson, E., and Kieff, E. (2002). Epstein-Barr Virus Nuclear

Antigen 3C Putative Repression Domain Mediates Coactivation of the LMP1 Promoter with EBNA-2. *J Virol* 76, 232–242.

Lin, J.C., DeClercq, E., and Pagano, J.S. (1987). Novel acyclic adenosine analogs inhibit Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1431–1433.

Lin, J.C., and Machida, H. (1988). Comparison of two bromovinyl nucleoside analogs, 1-beta-D-arabinofuranosyl-E-5-(2-bromovinyl)uracil and E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, with acyclovir in inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 32, 1068.

Lindhout, E., Lakeman, A., Mevissen, M.L., and de Groot, C. (1994). Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J. Exp. Med.* 179, 1173–1184.

Lindner, S.E., Zeller, K., Schepers, A., and Sugden, B. (2008). The Affinity of EBNA1 for Its Origin of DNA Synthesis Is a Determinant of the Origin's Replicative Efficiency. *J Virol* 82, 5693–5702.

Ling, P.D., Hsieh, J.J., Ruf, I.K., Rawlins, D.R., and Hayward, S.D. (1994a). EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *J Virol* 68, 5375–5383.

Ling, P.D., Hsieh, J.J., Ruf, I.K., Rawlins, D.R., and Hayward, S.D. (1994b). EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *J Virol* 68, 5375–5383.

Ling, P.D., Peng, R.S., Nakajima, A., Yu, J.H., Tan, J., Moses, S.M., Yang, W.-H., Zhao, B., Kieff, E., Bloch, K.D., et al. (2005). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J* 24, 3565–3575.

Ling, P.D., Rawlins, D.R., and Hayward, S.D. (1993). The Epstein-Barr virus immortalizing protein EBNA-2 is targeted to DNA by a cellular enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9237–9241.

Liu, J., Zhao, Y., Eilers, M., and Lin, A. (2009). Miz1 is a signal- and pathway-specific modulator or regulator (SMOR) that suppresses TNF- α -induced JNK1 activation. *PNAS* 106, 18279–18284.

Liu, Q., Basu, S., Qiu, Y., Tang, F., and Dong, F. (2010). A role of Miz-1 in Gfi-1-mediated transcriptional repression of CDKN1A. *Oncogene* 29, 2843–2852.

Liu, Y., Wang, X., Lo, A.K.F., Wong, Y.C., Cheung, A.L.M., and Tsao, S.W. (2002). Latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus inhibits cell growth and induces sensitivity to cisplatin in nasopharyngeal carcinoma cells. *J. Med. Virol.* 66, 63–69.

Liu, Y.-J., Joshua, D.E., Williams, G.T., Smith, C.A., Gordon, J., and MacLennan, I.C.M. (1989). Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. , Published Online: 28 December 1989; | Doi:10.1038/342929a0 342, 929–931.

Liu, Y.J., and Arpin, C. (1997). Germinal center development. *Immunol. Rev.* 156, 111–126.

- Lo, A.K.F., To, K.F., Lo, K.W., Lung, R.W.M., Hui, J.W.Y., Liao, G., and Hayward, S.D. (2007). Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16164–16169.
- Longnecker, R. (2000). Epstein-barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-barr virus persistence? In *Advances in Cancer Research*, (Academic Press), pp. 175–200.
- Longnecker, R., Druker, B., Roberts, T.M., and Kieff, E. (1991). An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J Virol* 65, 3681–3692.
- Longnecker, R., and Kieff, E. (1990). A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J Virol* 64, 2319–2326.
- Longnecker, R., Miller, C.L., Miao, X.Q., Marchini, A., and Kieff, E. (1992). The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore nonessential. *J Virol* 66, 6461–6469.
- Longnecker, R., Miller, C.L., Miao, X.Q., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1993a). The last seven transmembrane and carboxy-terminal cytoplasmic domains of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 (LMP2) are dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro. *J Virol* 67, 2006–2013.
- Longnecker, R., Miller, C.L., Tomkinson, B., Miao, X.Q., and Kieff, E. (1993b). Deletion of DNA encoding the first five transmembrane domains of Epstein-Barr virus latent membrane proteins 2A and 2B. *J Virol* 67, 5068–5074.
- Luka, J., Miller, G., Jörnvall, H., and Pearson, G.R. (1986). Characterization of the restricted component of Epstein-Barr virus early antigens as a cytoplasmic filamentous protein. *J Virol* 58, 748–756.
- Lupton, S., and Levine, A.J. (1985). Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Mol Cell Biol* 5, 2533–2542.
- Lynch, D.T., Zimmerman, J.S., and Rowe, D.T. (2002). Epstein–Barr Virus Latent Membrane Protein 2B (LMP2B) Co-Localizes with LMP2A in Perinuclear Regions in Transiently Transfected Cells. *J Gen Virol* 83, 1025–1035.
- MacLennan, I.C.M. (1994). Germinal Centers. *Annual Review of Immunology* 12, 117–139.
- Mainprize, T.G., Taylor, M.D., Rutka, J.T., and Dirks, P.B. (2001). Cip/Kip Cell-cycle Inhibitors: A Neuro-oncological Perspective. *Journal of Neuro-Oncology* 51, 205–218.
- Manet, E., Rigolet, A., Gruffat, H., Giot, J.F., and Sergeant, A. (1991). Domains of the Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucleic Acids Res* 19, 2661–2667.
- Manet, E., Sergeant, A., and Gruffat, H. (2003). Cycle productif du virus d’Epstein-Barr: rôle de la protéine virale EB1 dans l’activation du cycle productif et interactions protéine EB1-cellules hôte. *Virologie* 7, 111–123.

- Mannick, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A., and Kieff, E. (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* 65, 6826–6837.
- Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M., and Nicolas, J.-C. (1999). Mapping EBNA-1 Domains Involved in Binding to Metaphase Chromosomes. *J. Virol.* 73, 4385–4392.
- Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349.
- Marlowe, J.L., Knudsen, E.S., Schwemberger, S., and Puga, A. (2004). The Aryl Hydrocarbon Receptor Displaces P300 from E2F-Dependent Promoters and Represses S Phase-Specific Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 279, 29013–29022.
- Marshall, D., and Sample, C. (1995). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a transcriptional regulator. *J Virol* 69, 3624–3630.
- Maruo, S., Johannsen, E., Illanes, D., Cooper, A., and Kieff, E. (2003). Epstein-Barr Virus Nuclear Protein EBNA3A Is Critical for Maintaining Lymphoblastoid Cell Line Growth. *J Virol* 77, 10437–10447.
- Maruo, S., Johannsen, E., Illanes, D., Cooper, A., Zhao, B., and Kieff, E. (2005). Epstein-Barr Virus Nuclear Protein 3A Domains Essential for Growth of Lymphoblasts: Transcriptional Regulation through RBP-J κ /CBF1 Is Critical. *J Virol* 79, 10171–10179.
- Maruo, S., Wu, Y., Ishikawa, S., Kanda, T., Iwakiri, D., and Takada, K. (2006). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C is required for cell cycle progression and growth maintenance of lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19500–19505.
- Maruo, S., Wu, Y., Ito, T., Kanda, T., Kieff, E.D., and Takada, K. (2009). Epstein-Barr Virus Nuclear Protein EBNA3C Residues Critical for Maintaining Lymphoblastoid Cell Growth. *PNAS* 106, 4419–4424.
- Maruo, S., Zhao, B., Johannsen, E., Kieff, E., Zou, J., and Takada, K. (2011). Epstein-Barr virus nuclear antigens 3C and 3A maintain lymphoblastoid cell growth by repressing p16INK4A and p14ARF expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1919–1924.
- Masy, E., Adriaenssens, E., Montpellier, C., Cr  pieux, P., Moug  l, A., Quatannens, B., Goormachtigh, G., Faumont, N., Meggetto, F., Auriault, C., et al. (2002). Human Monocytic Cell Lines Transformed In Vitro by Epstein-Barr Virus Display a Type II Latency and LMP-1-Dependent Proliferation. *J Virol* 76, 6460–6472.
- Matsuo, T., Heller, M., Petti, L., O’Shiro, E., and Kieff, E. (1984). Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* 226, 1322–1325.
- Matsuzawa, S., and Reed, J.C. (2001). Siah-1, SIP, and Ebi Collaborate in a Novel Pathway for β -Catenin Degradation Linked to p53 Responses. *Molecular Cell* 7, 915–926.
- McClellan, M.J., Khasnis, S., Wood, C.D., Palermo, R.D., Schlick, S.N., Kanhere, A.S., Jenner, R.G., and West, M.J. (2012). Downregulation of Integrin Receptor-Signaling Genes

by Epstein-Barr Virus EBNA 3C Via Promoter-Proximal and -Distal Binding Elements. *J. Virol.* **86**, 5165–5178.

McShane, M.P., and Longnecker, R. (2004). Cell-surface expression of a mutated Epstein-Barr virus glycoprotein B allows fusion independent of other viral proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17474–17479.

Menet, A., Speth, C., Larcher, C., Prodinger, W.M., Schwendinger, M.G., Chan, P., Jäger, M., Schwarzmann, F., Recheis, H., Fontaine, M., et al. (1999). Epstein-Barr Virus Infection of Human Astrocyte Cell Lines. *J Virol* **73**, 7722–7733.

Mettenleiter, T.C., Klupp, B.G., and Granzow, H. (2009). Herpesvirus assembly: An update. *Virus Research* **143**, 222–234.

Miao, L., Song, Z., Jin, L., Zhu, Y.M., Wen, L.P., and Wu, M. (2010). ARF antagonizes the ability of Miz-1 to inhibit p53-mediated transactivation. *Oncogene* **29**, 711–722.

Miller, C.L., Lee, J.H., Kieff, E., Burkhardt, A.L., Bolen, J.B., and Longnecker, R. (1994a). Epstein-Barr virus protein LMP2A regulates reactivation from latency by negatively regulating tyrosine kinases involved in sIg-mediated signal transduction. *Infect Agents Dis* **3**, 128–136.

Miller, C.L., Lee, J.H., Kieff, E., and Longnecker, R. (1994b). An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 772–776.

Miller, G., and Lipman, M. (1973). Release of Infectious Epstein-Barr Virus by Transformed Marmoset Leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 190–194.

Miller, G., Lisco, H., Kohn, H.I., Stitt, D., and Enders, J.F. (1971). Establishment of cell lines from normal adult human blood leukocytes by exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **137**, 1459–1465.

Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D., and Lipman, M. (1972). Epstein-Barr Virus: Transformation, Cytopathic Changes, and Viral Antigens in Squirrel Monkey and Marmoset Leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 383–387.

Miller, N., and Hutt-Fletcher, L.M. (1992). Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes. *J Virol* **66**, 3409–3414.

Mirnezami, A.H., Campbell, S.J., Darley, M., Primrose, J.N., Johnson, P.W.M., and Blaydes, J.P. (2003). Hdm2 Recruits a Hypoxia-Sensitive Corepressor to Negatively Regulate p53-Dependent Transcription. *Current Biology* **13**, 1234–1239.

Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* **71**, 4882–4891.

Molesworth, S.J., Lake, C.M., Borza, C.M., Turk, S.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2000). Epstein-Barr Virus gH Is Essential for Penetration of B Cells but Also Plays a Role in Attachment of Virus to Epithelial Cells. *J. Virol.* **74**, 6324–6332.

- Molina, M.A., Sitja-Arnau, M., Lemoine, M.G., Frazier, M.L., and Sinicrope, F.A. (1999). Increased cyclooxygenase-2 expression in human pancreatic carcinomas and cell lines: growth inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res.* 59, 4356–4362.
- Moore, W.J., Zhang, C., and Clarke, P.R. (2002). Targeting of RCC1 to Chromosomes Is Required for Proper Mitotic Spindle Assembly in Human Cells. *Current Biology* 12, 1442–1447.
- Moorthy, R.K., and Thorley-Lawson, D.A. (1993). All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol* 67, 1638–1646.
- Morandell, D., Kaiser, A., Herold, S., Rostek, U., Lechner, S., Mitterberger, M.C., Jansen-Dürr, P., Eilers, M., and Zwerschke, W. (2012). The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein targets Myc-interacting zinc-finger protein-1. *Virology* 422, 242–253.
- Möröy, T., Saba, I., and Kosan, C. (2011). The role of the transcription factor Miz-1 in lymphocyte development and lymphomagenesis—Binding Myc makes the difference. *Seminars in Immunology* 23, 379–387.
- Morris, M.A., Dawson, C.W., and Young, L.S. (2009). Role of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1, LMP1, in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Future Oncol* 5, 811–825.
- Moumen, A., Masterson, P., O'Connor, M.J., and Jackson, S.P. (2005). hnRNP K: An HDM2 Target and Transcriptional Coactivator of p53 in Response to DNA Damage. *Cell* 123, 1065–1078.
- Müller, S., Hoege, C., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 202–210.
- Murray, R.J., Kurilla, M.G., Brooks, J.M., Thomas, W.A., Rowe, M., Kieff, E., and Rickinson, A.B. (1992). Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J. Exp. Med.* 176, 157–168.
- Murray, R.J., KURILLA, M.G., BROOKS, J.M., THOMAS, W.A., ROWE, M., KIEFF, E., and RICKINSON, A.B. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *The Journal of experimental medicine* 176, 157–168.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 379–393.
- Näher, H., Gissmann, L., Freese, U.K., Petzoldt, D., and Helfrich, S. (1992). Subclinical Epstein-Barr virus infection of both the male and female genital tract--indication for sexual transmission. *J. Invest. Dermatol.* 98, 791–793.
- Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M.T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M.G. (1994). The epstein-barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in burkitt lymphoma lines. *International Journal of Cancer* 57, 240–244.

Nanbo, A., Sugden, A., and Sugden, B. (2007). The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *EMBO J* 26, 4252–4262.

Nanbo, A., Yoshiyama, H., and Takada, K. (2005). Epstein-Barr Virus-Encoded Poly(A)-RNA Confers Resistance to Apoptosis Mediated through Fas by Blocking the PKR Pathway in Human Epithelial Intestine 407 Cells. *J Virol* 79, 12280–12285.

Nayyar, V.K., Shire, K., and Frappier, L. (2009). Mitotic Chromosome Interactions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) and Human EBNA1 Binding Protein 2 (EBP2). *J Cell Sci* 122, 4341–4350.

Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D., and Macara, I.G. (2001). Chromatin Docking and Exchange Activity Enhancement of RCC1 by Histones H2A and H2B. *Science* 292, 1540–1543.

Nemerow, G.R., and Cooper, N.R. (1984). Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* 132, 186–198.

Niculescu, A.B., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I. (1998). Effects of p21Cip1/Waf1 at Both the G1/S and the G2/M Cell Cycle Transitions: pRb Is a Critical Determinant in Blocking DNA Replication and in Preventing Endoreduplication. *Mol. Cell. Biol.* 18, 629–643.

Niederman, J.C. (1982). Infectious mononucleosis: observations on transmission. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 55, 259.

Niederman, J.C., McCollum, R.W., Henle, G., and Henle, W. (1968). Infectious Mononucleosis: Clinical Manifestations in Relation to EB Virus Antibodies. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 203, 205–209.

Nikitin, P.A., Yan, C.M., Forte, E., Bocedi, A., Tourigny, J.P., White, R.E., Allday, M.J., Patel, A., Dave, S.S., Kim, W., et al. (2010). An ATM/Chk2-mediated DNA damage responsive signaling pathway suppresses Epstein-Barr virus transformation of primary human B cells. *Cell Host Microbe* 8, 510–522.

Nitsche, F., Bell, A., and Rickinson, A. (1997). Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol* 71, 6619–6628.

Norman, A.W. (2006). Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147, 5542–5548.

Oda, T., Imai, S., Chiba, S., and Takada, K. (2000). Epstein-Barr Virus Lacking Glycoprotein gp85 Cannot Infect B Cells and Epithelial Cells. *Virology* 276, 52–58.

Ogryzko, V.V., Wong, P., and Howard, B.H. (1997). WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4877–4882.

Ohlsson, R. (2010). Gene expression: The coherent Mediator. *Nature* 467, 406–407.

Okumura, K., Zhao, M., Depinho, R.A., Furnari, F.B., and Cavenee, W.K. (2005). Cellular transformation by the MSP58 oncogene is inhibited by its physical interaction with the PTEN

tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2703–2706.

Old, L.J., Boyse, E.A., Oettgen, H.F., Harven, E.D., Geering, G., Williamson, B., and Clifford, P. (1966). Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 1699–1704.

Ollendorff, V., and Donoghue, D.J. (1997). The serine/threonine phosphatase PP5 interacts with CDC16 and CDC27, two tetratricopeptide repeat-containing subunits of the anaphase-promoting complex. *J. Biol. Chem.* 272, 32011–32018.

Owen, T.J., O'Neil, J.D., Dawson, C.W., Hu, C., Chen, X., Yao, Y., Wood, V.H., Mitchell, L.E., White, R.J., Young, L.S., et al. (2010). Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 enhances RNA polymerase III-dependent EBER expression through induction of EBER-associated cellular transcription factors. *Molecular Cancer* 9, 241.

Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *The EMBO Journal* 11, 961.

Pandya, J., and Walling, D.M. (2004). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 (LMP-1) Half-Life in Epithelial Cells Is Down-Regulated by Lytic LMP-1. *Journal of Virology* 78, 8404–8410.

Pandya, J., and Walling, D.M. (2006). Oncogenic Activity of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 (LMP-1) Is Down-Regulated by Lytic LMP-1. *J. Virol.* 80, 8038–8046.

Parker, G.A., Crook, T., Bain, M., Sara, E.A., Farrell, P.J., and Allday, M.J. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* 13, 2541–2549.

Parker, G.A., Touitou, R., and Allday, M.J. (2000). Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. , Published Online: 09 February 2000; | Doi:10.1038/sj.onc.1203327 19,.

Paschos, K., Parker, G.A., Watanatanasup, E., White, R.E., and Allday, M.J. (2012). BIM Promoter Directly Targeted by EBNA3C in Polycomb-Mediated Repression by EBV. *Nucl. Acids Res.*

Paschos, K., Smith, P., Anderton, E., Middeldorp, J.M., White, R.E., and Allday, M.J. (2009). Epstein-Barr Virus Latency in B Cells Leads to Epigenetic Repression and CpG Methylation of the Tumour Suppressor Gene Bim. *PLoS Pathogens* 5, e1000492.

Patel, J.H., and McMahon, S.B. (2006). Targeting of Miz-1 Is Essential for Myc-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 281, 3283–3289.

Patel, J.H., and McMahon, S.B. (2007). BCL2 Is a Downstream Effector of MIZ-1 Essential for Blocking c-MYC-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282, 5–13.

Patel, M., Leivers, S.J., and Brickell, P.M. (1990). Regulation of c-fgr proto-oncogene expression in Epstein-Barr virus infected B-cell lines. *Int. J. Cancer* 45, 342–346.

Pearson, G., Dewey, F., Klein, G., Henle, G., and Henle, W. (1970). Relation between neutralization of Epstein-Barr virus and antibodies to cell-membrane antigens-induced by the

virus. *J. Natl. Cancer Inst.* **45**, 989–995.

Pearson, G.R., Luka, J., Petti, L., Sample, J., Birkenbach, M., Braun, D., and Kieff, E. (1987). Identification of an Epstein-Barr virus early gene encoding a second component of the restricted early antigen complex. *Virology* **160**, 151–161.

Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., et al. (2003). Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **5**, 552–558.

Pekarsky, Y., Hallas, C., and Croce, C.M. (2001). The role of TCL1 in human T-cell leukemia. *Oncogene* **20**, 5638–5643.

Pelengaris, S., and Khan, M. (2003). The many faces of c-MYC. *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 129–136.

Pelengaris, S., Rudolph, B., and Littlewood, T. (2000). Action of Myc in vivo - proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 100–105.

Peng, J.-P., Chang, H.-C., Hwang, C.-F., and Hung, W.-C. (2005). Overexpression of cyclooxygenase-2 in nasopharyngeal carcinoma and association with lymph node metastasis. *Oral Oncol.* **41**, 903–908.

Perez-Torrado, R., Yamada, D., and Defossez, P.-A. (2006). Born to bind: the BTB protein–protein interaction domain. *BioEssays* **28**, 1194–1202.

Petti, L., and Kieff, E. (1988). A sixth Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA3B) is expressed in latently infected growth-transformed lymphocytes. *J Virol* **62**, 2173–2178.

Petti, L., Sample, C., and Kieff, E. (1990). Subnuclear localization and phosphorylation of Epstein-Barr virus latent infection nuclear proteins. *Virology* **176**, 563–574.

Petti, L., Sample, J., Wang, F., and Kieff, E. (1988). A fifth Epstein-Barr virus nuclear protein (EBNA3C) is expressed in latently infected growth-transformed lymphocytes. *J Virol* **62**, 1330–1338.

Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hänel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *The EMBO Journal* **16**, 5672–5686.

Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* **304**, 734–736.

Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., and Dalla-Favera, R. (2005). BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nature Immunology* **6**, 1054–1060.

Piluso, D., Bilan, P., and Capone, J.P. (2002). Host Cell Factor-1 Interacts with and Antagonizes Transactivation by the Cell Cycle Regulatory Factor Miz-1. *J. Biol. Chem.* **277**, 46799–46808.

Pizzo, P.A., Magrath, I.T., Chattopadhyay, S.K., Biggar, R.J., and Gerber, P. (1978). A new

tumour-derived transforming strain of Epstein-Barr virus. *Nature* 272, 629–631.

Polack, A., Hörtnagel, K., Pajic, A., Christoph, B., Baier, B., Falk, M., Mautner, J., Geltinger, C., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1996). c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10411–10416.

Poland, A., and Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 22, 517–554.

Polvino-Bodnar, M., Kiso, J., and Schaffer, P.A. (1988). Mutational analysis of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA 1). *Nucleic Acids Res* 16, 3415–3435.

Prince, S., Keating, S., Fielding, C., Brennan, P., Floettmann, E., and Rowe, M. (2003). Latent Membrane Protein 1 Inhibits Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Induction and Progress via Different Mechanisms. *J Virol* 77, 5000–5007.

Puga, A., Barnes, S.J., Dalton, T.P., Chang, C.-Y., Knudsen, E.S., and Maier, M.A. (2000). Aromatic Hydrocarbon Receptor Interaction with the Retinoblastoma Protein Potentiates Repression of E2F-Dependent Transcription and Cell Cycle Arrest. *J. Biol. Chem.* 275, 2943–2950.

Pugh, B.F., and Tjian, R. (1992). Diverse Transcriptional Functions of the Multisubunit Eukaryotic TFIID Complex. *J. Biol. Chem.* 267, 679–682.

Qu, L., and Rowe, D.T. (1992). Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *Journal of Virology* 66, 3715.

Raab-Traub, N. (2002). Epstein–Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Seminars in Cancer Biology* 12, 431–441.

Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L., and Miller, G. (1982). Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J Virol* 44, 834–844.

Radkov, S.A., Bain, M., Farrell, P.J., West, M., Rowe, M., and Allday, M.J. (1997). Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J Virol* 71, 8552–8562.

Radkov, S.A., Touitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T., and Allday, M.J. (1999). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Interacts with Histone Deacetylase To Repress Transcription. *J Virol* 73, 5688–5697.

Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D., and Hayward, G.S. (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* 42, 859–868.

Rechsteiner, M.P., Berger, C., Weber, M., Sigrist, J.A., Nadal, D., and Bernasconi, M. (2007a). Silencing of Latent Membrane Protein 2B Reduces Susceptibility to Activation of Lytic Epstein–Barr Virus in Burkitt’s Lymphoma Akata Cells. *J Gen Virol* 88, 1454–1459.

Rechsteiner, M.P., Berger, C., Zauner, L., Sigrist, J.A., Weber, M., Longnecker, R.,

- Bernasconi, M., and Nadal, D. (2007b). Latent Membrane Protein 2B Regulates Susceptibility to Induction of Lytic Epstein-Barr Virus Infection. *Journal of Virology* 82, 1739–1747.
- Reddy, K.B., Krueger, J.S., Kondapaka, S.B., and Diglio, C.A. (1999). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the expression of progelatinase B (MMP-9) in breast epithelial cells. *Int. J. Cancer* 82, 268–273.
- Reed, J.C., and Ely, K.R. (2002). Degrading liaisons: Siah structure revealed. *Nature Structural & Molecular Biology* 9, 8–10.
- Reisman, D., and Sugden, B. (1986). trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol Cell Biol* 6, 3838–3846.
- Reisman, D., Yates, J., and Sugden, B. (1985). A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol Cell Biol* 5, 1822–1832.
- Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M., and Wittinghofer, A. (1998). The 1.7 Å crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature* 392, 97–101.
- Resnitzky, D., Hengst, L., and Reed, S.I. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4347–4352.
- Revoltella, R.P., Vigneti, E., Fruscalzo, A., Park, M., Ragona, G., Rocchi, G., and Calef, E. (1989). Epstein-Barr Virus DNA Sequences in Precursor Monocyte-Macrophage Cell Lines Established from the Bone Marrow of Children with Maturation Defects of Haematopoiesis. *J Gen Virol* 70, 1203–1215.
- Ricci, E.P., Mure, F., Gruffat, H., Decimo, D., Medina-Palazon, C., Ohlmann, T., and Manet, E. (2009). Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein–Barr virus mRNA export factor EB2. *Nucleic Acids Res* 37, 4932–4943.
- Richardson, K.S., and Zundel, W. (2005). The Emerging Role of the COP9 Signalosome in Cancer. *Mol Cancer Res* 3, 645–653.
- Ricksten, A., Kallin, B., Alexander, H., Dillner, J., Fåhræus, R., Klein, G., Lerner, R., and Rymo, L. (1988). BamHI E region of the Epstein-Barr virus genome encodes three transformation-associated nuclear proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 995–999.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 402–412.
- Robertson, E.S., Grossman, S., Johannsen, E., Miller, C., Lin, J., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J Virol* 69, 3108–3116.
- Robertson, E.S., Lin, J., and Kieff, E. (1996). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J Virol* 70, 3068–3074.
- Robertson, E.S., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1994). An Epstein-Barr virus with a 58-

- kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro. *J Virol* 68, 1449–1458.
- Rogers, R.P., Woisetschlaeger, M., and Speck, S.H. (1990). Alternative splicing dictates translational start in Epstein-Barr virus transcripts. *EMBO J* 9, 2273–2277.
- Rooney, C.M., Rowe, D.T., Ragot, T., and Farrell, P.J. (1989). The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *J Virol* 63, 3109–3116.
- Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R., and Steitz, J.A. (1981). Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAIL. *Mol Cell Biol* 1, 785–796.
- Rosendorff, A., Illanes, D., David, G., Lin, J., Kieff, E., and Johannsen, E. (2004). EBNA3C Coactivation with EBNA2 Requires a SUMO Homology Domain. *J Virol* 78, 367–377.
- Roussel, M.F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18, 5311–5317.
- Le Roux, A., Kerdiles, B., Walls, D., Dedieu, J.-F., and Perricaudet, M. (1994). The Epstein-Barr Virus Determined Nuclear Antigens EBNA-3A, -3B, and -3C Repress EBNA-2-Mediated Transactivation of the Viral Terminal Protein 1 Gene Promoter. *Virology* 205, 596–602.
- Rovedo, M., and Longnecker, R. (2007). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2B (LMP2B) Modulates LMP2A Activity. *J. Virol.* 81, 84–94.
- Rowe, M., Khanna, R., Jacob, C.A., Argat, V., Kelly, A., Powis, S., Belich, M., Groom-Carter, D., Lee, S., Burrows, S.R., et al. (2005). Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *European Journal of Immunology* 25, 1374–1384.
- Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D.S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E., and Rickinson, A.B. (1994). Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* 68, 5602–5612.
- Rowe, M., Rowe, D.T., Gregory, C.D., Young, L.S., Farrell, P.J., Rupani, H., and Rickinson, A.B. (1987). Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 6, 2743–2751.
- Rowe, M., Young, L.S., Cadwallader, K., Petti, L., Kieff, E., and Rickinson, A.B. (1989). Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J Virol* 63, 1031–1039.
- Rowland, B.D., and Peeper, D.S. (2006). KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 11–23.
- Russell, R.L., Pedersen, A.N., Kantor, J., Geisinger, K., Long, R., Zbieranski, N., Townsend, A., Shelton, B., Br  nner, N., and Kute, T.E. (1998). Relationship of nm23 to proteolytic

factors, proliferation and motility in breast cancer tissues and cell lines. *Br. J. Cancer* 78, 710–717.

Rymo, L. (1979). Identification of transcribed regions of Epstein-Barr virus DNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol* 32, 8–18.

Sadler, R.H., and Raab-Traub, N. (1995a). Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol* 69, 1132–1141.

Sadler, R.H., and Raab-Traub, N. (1995b). The Epstein-Barr virus 3.5-kilobase latent membrane protein 1 mRNA initiates from a TATA-Less promoter within the first terminal repeat. *J Virol* 69, 4577–4581.

Saha, A., Bamidele, A., Murakami, M., and Robertson, E.S. (2010). EBNA3C Attenuates the Function of p53 through Interaction with Inhibitor of Growth Family Proteins 4 and 5. *Journal of Virology* 85, 2079–2088.

Saha, A., Halder, S., Upadhyay, S.K., Lu, J., Kumar, P., Murakami, M., Cai, Q., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Facilitates G1-S Transition by Stabilizing and Enhancing the Function of Cyclin D1. *PLoS Pathog* 7,.

Saha, A., Lu, J., Morizur, L., Upadhyay, S.K., Aj, M.P., and Robertson, E.S. (2012). E2F1 Mediated Apoptosis Induced by the DNA Damage Response Is Blocked by EBV Nuclear Antigen 3C in Lymphoblastoid Cells. *PLoS Pathog.* 8, e1002573.

Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Bajaj, B., Sims, K., and Robertson, E.S. (2009). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Augments Mdm2-Mediated P53 Ubiquitination and Degradation by Deubiquitinating Mdm2. *J. Virol.* 83, 4652–4669.

Said, J.W., Hoyer, K.K., French, S.W., Rosenfelt, L., Garcia-Lloret, M., Koh, P.J., Cheng, T.C., Sultur, G.G., Pinkus, G.S., Kuehl, W.M., et al. (2001). TCL1 oncogene expression in B cell subsets from lymphoid hyperplasia and distinct classes of B cell lymphoma. *Lab. Invest.* 81, 555–564.

Saito, M., Novak, U., Piovan, E., Basso, K., Sumazin, P., Schneider, C., Crespo, M., Shen, Q., Bhagat, G., Califano, A., et al. (2009). BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *PNAS* 106, 11294–11299.

Sakai, T., Taniguchi, Y., Tamura, K., Minoguchi, S., Fukuhara, T., Strobl, L.J., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G.W., and Honjo, T. (1998). Functional Replacement of the Intracellular Region of the Notch1 Receptor by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2. *J Virol* 72, 6034–6039.

Sample, C., and Parker, B. (1994). Biochemical Characterization of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A and 3C Proteins. *Virology* 205, 534–539.

Sample, J., Brooks, L., Sample, C., Young, L., Rowe, M., Gregory, C., Rickinson, A., and Kieff, E. (1991). Restricted Epstein-Barr virus protein expression in Burkitt lymphoma is due to a different Epstein-Barr nuclear antigen 1 transcriptional initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6343–6347.

Sample, J., Hummel, M., Braun, D., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1986). Nucleotide

sequences of mRNAs encoding Epstein-Barr virus nuclear proteins: a probable transcriptional initiation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5096–5100.

Sample, J., and Kieff, E. (1990). Transcription of the Epstein-Barr virus genome during latency in growth-transformed lymphocytes. *J Virol* 64, 1667–1674.

Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* 64, 4084–4092.

Sandberg, M.L., Kaykas, A., and Sugden, B. (2000). Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr Virus Inhibits as Well as Stimulates Gene Expression. *J Virol* 74, 9755–9761.

Sato, H., Takimoto, T., Tanaka, S., Tanaka, J., and Raab-Traub, N. (1990). Concatameric replication of Epstein-Barr virus: structure of the termini in virus-producer and newly transformed cell lines. *J Virol* 64, 5295–5300.

Savard, M., Bélanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L., and Gosselin, J. (2000). Infection of Primary Human Monocytes by Epstein-Barr Virus. *J Virol* 74, 2612–2619.

Schaadt, E., Baier, B., Mautner, J., Bornkamm, G.W., and Adler, B. (2005). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A Mimics B-Cell Receptor-Dependent Virus Reactivation. *J Gen Virol* 86, 551–559.

Schaefer, B.C., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1995a). Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10565–10569.

Schaefer, B.C., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1995b). The Epstein-Barr virus BamHI F promoter is an early lytic promoter: lack of correlation with EBNA 1 gene transcription in group 1 Burkitt's lymphoma cell lines. *J Virol* 69, 5039–5047.

Schaefer, B.C., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1997). Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol Cell Biol* 17, 364–377.

Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J.L., Harwood, J., Diffley, J.F.X., and Hammerschmidt, W. (2001). Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *EMBO J* 20, 4588–4602.

Scheufler, C., Brinker, A., Bourenkov, G., Pegoraro, S., Moroder, L., Bartunik, H., Hartl, F.U., and Moarefi, I. (2000). Structure of TPR Domain-Peptide Complexes: Critical Elements in the Assembly of the Hsp70-Hsp90 Multichaperone Machine. *Cell* 101, 199–210.

Schlager, S., Speck, S.H., and Woisetschlager, M. (1996). Transcription of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) gene occurs before induction of the BCR2 (Cp) EBNA gene promoter during the initial stages of infection in B cells. *J Virol* 70, 3561–3570.

Sears, J., Ujihara, M., Wong, S., Ott, C., Middeldorp, J., and Aiyar, A. (2004). The Amino Terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 1 Contains AT Hooks That Facilitate the Replication and Partitioning of Latent EBV Genomes by Tethering Them to Cellular Chromosomes. *J Virol* 78, 11487–11505.

- Seino, H., Hisamoto, N., Uzawa, S., Sekiguchi, T., and Nishimoto, T. (1992). DNA-binding domain of RCC1 protein is not essential for coupling mitosis with DNA replication. *J Cell Sci* 102, 393–400.
- Semmes, O.J., Chen, L., Sarisky, R.T., Gao, Z., Zhong, L., and Hayward, S.D. (1998). Mta Has Properties of an RNA Export Protein and Increases Cytoplasmic Accumulation of Epstein-Barr Virus Replication Gene mRNA. *J Virol* 72, 9526–9534.
- Seoane, J., Le, H.-V., and Massagué, J. (2002). Myc suppression of the p21Cip1 Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419, 729–734.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massagué, J. (2001). TGF β influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nature Cell Biology* 3, 400–408.
- Serio, T.R., Cahill, N., Prout, M.E., and Miller, G. (1998). A Functionally Distinct TATA Box Required for Late Progression through the Epstein-Barr Virus Life Cycle. *Journal of Virology* 72, 8338.
- Seto, E., Moosmann, A., Grömminger, S., Walz, N., Grundhoff, A., and Hammerschmidt, W. (2010). Micro RNAs of Epstein-Barr Virus Promote Cell Cycle Progression and Prevent Apoptosis of Primary Human B Cells. *PLoS Pathogens* 6, e1001063.
- Sewalt, R.G.A.B., Gunster, M.J., Vlag, J. van der, Satijn, D.P.E., and Otte, A.P. (1999). C-Terminal Binding Protein Is a Transcriptional Repressor That Interacts with a Specific Class of Vertebrate Polycomb Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 19, 777.
- Shah, W.A., Ambinder, R.F., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1992). Binding of EBNA-1 to DNA creates a protease-resistant domain that encompasses the DNA recognition and dimerization functions. *J Virol* 66, 3355–3362.
- Shair, K.H.Y., Bendt, K.M., Edwards, R.H., Bedford, E.C., Nielsen, J.N., and Raab-Traub, N. (2007). EBV Latent Membrane Protein 1 Activates Akt, NF κ B, and Stat3 in B Cell Lymphomas. *PLoS Pathog* 3,.
- Shannon-Lowe, C.D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A.B., and Delecluse, H.-J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein–Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7065–7070.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of Mammalian G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Genes Dev.* 9, 1149–1163.
- Shi, H., Chen, S., Jin, H., Xu, C., Dong, G., Zhao, Q., Wang, W., Zhang, H., Lin, W., Zhang, J., et al. (2009). Downregulation of MSP58 inhibits growth of human colorectal cancer cells via regulation of the cyclin D1-cyclin-dependent kinase 4-p21 pathway. *Cancer Sci.* 100, 1585–1590.
- Shimakage, M., Kimura, M., Yanoma, S., Ibe, M., Yokota, S., Tsujino, G., Kozuka, T., Dezawa, T., Tamura, S., Ohshima, A., et al. (1999). Expression of latent and replicative-infection genes of Epstein-Barr virus in macrophage. *Archives of Virology* 144, 157–166.
- Shimono, K., Shimono, Y., Shimokata, K., Ishiguro, N., and Takahashi, M. (2005).

Microspherule protein 1, Mi-2beta, and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription. *J. Biol. Chem.* 280, 39436–39447.

Shire, K., Ceccarelli, D.F.J., Avolio-Hunter, T.M., and Frappier, L. (1999). EBP2, a Human Protein That Interacts with Sequences of the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Important for Plasmid Maintenance. *J Virol* 73, 2587–2595.

Shire, K., Kapoor, P., Jiang, K., Hing, M.N.T., Sivachandran, N., Nguyen, T., and Frappier, L. (2006). Regulation of the EBNA1 Epstein-Barr Virus Protein by Serine Phosphorylation and Arginine Methylation. *J Virol* 80, 5261–5272.

Shiseki, M., Nagashima, M., Pedeux, R.M., Kitahama-Shiseki, M., Miura, K., Okamura, S., Onogi, H., Higashimoto, Y., Appella, E., Yokota, J., et al. (2003). p29ING4 and p28ING5 bind to p53 and p300, and enhance p53 activity. *Cancer Res.* 63, 2373–2378.

Silins, S.L., and Sculley, T.B. (1994). Modulation of Vimentin, the CD40 Activation Antigen and Burkitt's Lymphoma Antigen (CD77) by the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen EBNA-4. *Virology* 202, 16–24.

Silins, S.L., and Sculley, T.B. (1995). Burkitt's lymphoma cells are resistant to programmed cell death in the presence of the Epstein-Barr virus latent antigen EBNA-4. *International Journal of Cancer* 60, 65–72.

Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2009). Mechanisms of Polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 697–708.

Sinclair, A.J., Brimmell, M., Shanahan, F., and Farrell, P.J. (1991). Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J Virol* 65, 2237–2244.

Sinclair, A.J., Palmero, I., Peters, G., and Farrell, P.J. (1994). EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J* 13, 3321–3328.

Sixbey, J.W., and Yao, Q.Y. (1992). Immunoglobulin A-Induced Shift of Epstein-Barr Virus Tissue Tropism. *Science* 255, 1578–1580.

Sjöblom, A., Jansson, A., Yang, W., Lán, S., Nilsson, T., and Rymo, L. (1995a). PU Box-Binding Transcription Factors and a POU Domain Protein Cooperate in the Epstein—Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 2-Induced Transactivation of the EBV Latent Membrane Protein 1 Promoter. *J Gen Virol* 76, 2679–2692.

Sjöblom, A., Nerstedt, A., Jansson, A., and Rymo, L. (1995b). Domains of the Epstein—Barr Virus Nuclear Antigen 2 (EBNA2) Involved in the Transactivation of the Latent Membrane Protein 1 and the EBNA Cp Promoters. *J Gen Virol* 76, 2669–2678.

Skalska, L., White, R.E., Franz, M., Ruhmann, M., and Allday, M.J. (2010). Epigenetic Repression of p16INK4A by Latent Epstein-Barr Virus Requires the Interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP. *PLoS Pathogens* 6, e1000951.

Smith, P.R., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, C.E., Griffin, B.E., Karran, L., Wang, Y., Hayward, S.D., and Farrell, P.J. (2000a). Structure and Coding Content of CST (BART) Family RNAs of Epstein-Barr Virus. *J Virol* 74, 3082–3092.

- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000b). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145–182.
- Snudden, D.K., Hearing, J., Smith, P.R., Grässer, F.A., and Griffin, B.E. (1994). EBNA-1, the major nuclear antigen of Epstein-Barr virus, resembles “RGG” RNA binding proteins. *EMBO J* 13, 4840–4847.
- Sodeik, B., Ebersold, M.W., and Helenius, A. (1997). Microtubule-mediated Transport of Incoming Herpes Simplex Virus 1 Capsids to the Nucleus. *J Cell Biol* 136, 1007–1021.
- Soliman, M.A., and Riabowol, K. (2007). After a decade of study-ING, a PHD for a versatile family of proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 32, 509–519.
- Speck, P., Kline, K.A., Cheresch, P., and Longnecker, R. (1999). Epstein–Barr Virus Lacking Latent Membrane Protein 2 Immortalizes B Cells with Efficiency Indistinguishable from That of Wild-Type Virus. *J Gen Virol* 80, 2193–2203.
- Speck, S.H., and Strominger, J.L. (1985). Analysis of the transcript encoding the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen I: a potentially polycistronic message generated by long-range splicing of several exons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8305–8309.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., M[ouml]l[ouml]y, T., Bartek, J., Massagu[eacute], J., H[auml]nel, F., et al. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nature Cell Biology* 3, 392–399.
- Stamenkovic, I. (2000). Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 10, 415–433.
- Staudt, L.M. (2000). The Molecular and Cellular Origins of Hodgkin’s Disease. *J Exp Med* 191, 207–212.
- Stead, M.A., Trinh, C.H., Garnett, J.A., Carr, S.B., Baron, A.J., Edwards, T.A., and Wright, S.C. (2007). A Beta-Sheet Interaction Interface Directs the Tetramerisation of the Miz-1 POZ Domain. *Journal of Molecular Biology* 373, 820–826.
- Steeg, P.S., Bevilacqua, G., Pozzatti, R., Liotta, L.A., and Sobel, M.E. (1988). Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res.* 48, 6550–6554.
- Sternås, L., Middleton, T., and Sugden, B. (1990). The average number of molecules of Epstein-Barr nuclear antigen 1 per cell does not correlate with the average number of Epstein-Barr virus (EBV) DNA molecules per cell among different clones of EBV-immortalized cells. *J Virol* 64, 2407–2410.
- Steven, N.M., Leese, A.M., Annels, N.E., Lee, S.P., and Rickinson, A.B. (1996). Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory. *J. Exp. Med.* 184, 1801–1813.
- Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J.S., Nandra, S.K., and Privé, G.G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* 6, R82.

- Stommel, J.M., and Wahl, G.M. (2004). Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *The EMBO Journal* 23, 1547–1556.
- Subramanian, C., Cotter, M.A., and Robertson, E.S. (2001). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: A molecular link to cancer metastasis. *Nature Medicine* 7, 350–355.
- Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R., and Robertson, E.S. (2002). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C and Prothymosin Alpha Interact with the p300 Transcriptional Coactivator at the CH1 and CH3/HAT Domains and Cooperate in Regulation of Transcription and Histone Acetylation. *J Virol* 76, 4699–4708.
- Subramanian, C., and Robertson, E.S. (2002). The Metastatic Suppressor Nm23-H1 Interacts with EBNA3C at Sequences Located between the Glutamine- and Proline-Rich Domains and Can Cooperate in Activation of Transcription. *J Virol* 76, 8702–8709.
- Sundqvist, A., Sollerbrant, K., and Svensson, C. (1998). The carboxy-terminal region of adenovirus E1A activates transcription through targeting of a C-terminal binding protein-histone deacetylase complex. *FEBS Lett.* 429, 183–188.
- Sung, N.S., Kenney, S., Gutsch, D., and Pagano, J.S. (1991). EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol* 65, 2164–2169.
- Swaminathan, S., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1991). Recombinant Epstein-Barr virus with small RNA (EBER) genes deleted transforms lymphocytes and replicates in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1546–1550.
- Tabiasco, J., Vercellone, A., Meggetto, F., Hudrisier, D., Brousset, P., and Fournié, J.-J. (2003). Acquisition of Viral Receptor by NK Cells Through Immunological Synapse. *J Immunol* 170, 5993–5998.
- Takada, K., and Ono, Y. (1989). Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J Virol* 63, 445–449.
- Tang, J., Qu, L.-K., Zhang, J., Wang, W., Michaelson, J.S., Degenhardt, Y.Y., El-Deiry, W.S., and Yang, X. (2006). Critical role for Daxx in regulating Mdm2. *Nat. Cell Biol.* 8, 855–862.
- Taniguchi, Y., Furukawa, T., Tun, T., Han, H., and Honjo, T. (1998). LIM Protein KyoT2 Negatively Regulates Transcription by Association with the RBP-J DNA-Binding Protein. *Mol Cell Biol* 18, 644–654.
- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). Epstein-barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50, 203–213.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7837–7841.

- Tellam, J., Connolly, G., Green, K.J., Miles, J.J., Moss, D.J., Burrows, S.R., and Khanna, R. (2004). Endogenous Presentation of CD8+ T Cell Epitopes from Epstein-Barr Virus-encoded Nuclear Antigen 1. *J Exp Med* 199, 1421–1431.
- Thomas, J.A., Hotchin, N.A., Allday, M.J., Amlot, P., Rose, M., Yacoub, M., and Crawford, D.H. (1990). Immunohistology of Epstein-Barr virus-associated antigens in B cell disorders from immunocompromised individuals. *Transplantation* 49, 944–953.
- Thompson, M.P., and Kurzrock, R. (2004). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Clin Cancer Res* 10, 803–821.
- Thorley-Lawson, D.A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nature Reviews Immunology* 1, 75–82.
- Thorley-Lawson, D.A. (2005). EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 251–261; quiz 262.
- Thorley-Lawson, D.A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 350, 1328–1337.
- Tierney, R.J., Kirby, H.E., Nagra, J.K., Desmond, J., Bell, A.I., and Rickinson, A.B. (2000). Methylation of Transcription Factor Binding Sites in the Epstein-Barr Virus Latent Cycle Promoter Wp Coincides with Promoter Down-Regulation during Virus-Induced B-Cell Transformation. *Journal of Virology* 74, 10468.
- Timmers, H.T., Meyers, R.E., and Sharp, P.A. (1992). Composition of transcription factor B-TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8140–8144.
- Toczyski, D.P., and Steitz, J.A. (1993). The cellular RNA-binding protein EAP recognizes a conserved stem-loop in the Epstein-Barr virus small RNA EBER 1. *Mol Cell Biol* 13, 703–710.
- Tomkinson, B., and Kieff, E. (1992a). Second-site homologous recombination in Epstein-Barr virus: insertion of type 1 EBNA 3 genes in place of type 2 has no effect on in vitro infection. *J Virol* 66, 780–789.
- Tomkinson, B., and Kieff, E. (1992b). Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol* 66, 2893–2903.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67, 2014–2025.
- Tomoda, K., Kubota, Y., and Kato, J. (1999). Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 398, 160–165.
- Tong, X., Drapkin, R., Reinberg, D., and Kieff, E. (1995a). The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3259–3263.
- Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G., and Kieff, E. (1995b). The Epstein-

Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol Cell Biol* 15, 4735–4744.

Tong, X., Wang, F., Thut, C.J., and Kieff, E. (1995c). The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain can interact with TFIIB, TAF40, and RPA70 but not with TATA-binding protein. *J Virol* 69, 585–588.

Torii, T., Konishi, K., Sample, J., and Takada, K. (1998). The Truncated Form of the Epstein-Barr Virus LMP-1 Is Dispensable or Complimentable by the Full-Length Form in Virus Infection and Replication. *Virology* 251, 273–278.

Touitou, R., Hickabottom, M., Parker, G., Crook, T., and Allday, M.J. (2001). Physical and Functional Interactions between the Corepressor CtBP and the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen EBNA3C. *J Virol* 75, 7749–7755.

Touitou, R., O’Nions, J., Heaney, J., and Allday, M.J. (2005). Epstein-Barr Virus EBNA3 Proteins Bind to the C8/A7 Subunit of the 20S Proteasome and Are Degraded by 20S Proteasomes in Vitro, but Are Very Stable in Latently Infected B Cells. *J Gen Virol* 86, 1269–1277.

Tsao, S.W., Tramoutanis, G., Dawson, C.W., Lo, A.K., and Huang, D.P. (2002). The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Seminars in Cancer Biology* 12, 473–487.

Tsoukas, C.D., and Lambris, J.D. (1988). Expression of CR2/EBV receptors on human thymocytes detected by monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18, 1299–1302.

Tugizov, S.M., Berline, J.W., and Palefsky, J.M. (2003). Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nature Medicine* 9, 307–314.

Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 Signals by Epstein-Barr Virus LMP1 in B Lymphocyte Responses. *Science* 286, 300–303.

Urien, G., Buisson, M., Chambard, P., and Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites. *EMBO J.* 8, 1447–1453.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131–149.

Vervoorts, J., Lüscher-Firzlaff, J., and Lüscher, B. (2006). The Ins and Outs of MYC Regulation by Posttranslational Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 281, 34725–34729.

Vidal, M., and Legrain, P. (1999). Yeast forward and reverse “n”-hybrid systems. *Nucleic Acids Research* 27, 919.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.

Voitenleitner, C., Fanning, E., and Nasheuer, H.P. (1997). Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA

replication in vitro. *Oncogene* 14, 1611–1615.

Voo, K.S., Fu, T., Wang, H.Y., Tellam, J., Heslop, H.E., Brenner, M.K., Rooney, C.M., and Wang, R.-F. (2004). Evidence for the Presentation of Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Peptides to CD8⁺ T Lymphocytes. *J Exp Med* 199, 459–470.

Walhout, A.J.M., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorson, M.A., van den Heuvel, S., and Vidal, M. (2000). [34] GATEWAY recombinational cloning: Application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. In *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins - Part C: Protein-Protein Interactions and Genomics*, (Academic Press), pp. 575–IN7.

Waltzer, L., Bourillot, P.Y., Sergeant, A., and Manet, E. (1995). RBP-J kappa repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Res* 23, 4939–4945.

Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A., and Manet, E. (1994). The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J* 13, 5633–5638.

Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A., and Manet, E. (1996). Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J Virol* 70, 5909–5915.

Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43, 831–840.

Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1988a). The truncated form of the Epstein-Barr virus latent-infection membrane protein expressed in virus replication does not transform rodent fibroblasts. *Journal of Virology* 62, 2337.

Wang, D., Liebowitz, D., Wang, F., Gregory, C., Rickinson, A., Larson, R., Springer, T., and Kieff, E. (1988b). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J. Virol.* 62, 4173–4184.

Wang, D., Liebowitz, D., Wang, F., Gregory, C., Rickinson, A., Larson, R., Springer, T., and Kieff, E. (1988c). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J Virol* 62, 4173–4184.

Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990a). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 64, 2309–2318.

Wang, F., Gregory, C.D., Rowe, M., Rickinson, A.B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3452–3456.

- Wang, F., Kikutani, H., Tsang, S.F., Kishimoto, T., and Kieff, E. (1991). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivates a cis-acting CD23 DNA element. *J Virol* 65, 4101–4106.
- Wang, F., Tsang, S.F., Kurilla, M.G., Cohen, J.I., and Kieff, E. (1990b). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 Transactivates Latent Membrane Protein LMP1. *J. Virol.* 64, 3407–3416.
- Wang, L., Grossman, S.R., and Kieff, E. (2000). Epstein–Barr Virus Nuclear Protein 2 Interacts with P300, CBP, and PCAF Histone Acetyltransferases in Activation of the LMP1 Promoter. *PNAS* 97, 430–435.
- Wang, P., Gao, H., Ni, Y., Wang, B., Wu, Y., Ji, L., Qin, L., Ma, L., and Pei, G. (2003a). B-Arrestin 2 Functions as a G-Protein-Coupled Receptor-Activated Regulator of Oncoprotein Mdm2. *J. Biol. Chem.* 278, 6363–6370.
- Wang, P., Wu, Y., Ge, X., Ma, L., and Pei, G. (2003b). Subcellular Localization of B-Arrestins Is Determined by Their Intact N Domain and the Nuclear Export Signal at the C Terminus. *J. Biol. Chem.* 278, 11648–11653.
- Wang, X., and Hutt-Fletcher, L.M. (1998). Epstein-Barr Virus Lacking Glycoprotein gp42 Can Bind to B Cells but Is Not Able To Infect. *J Virol* 72, 158–163.
- Wang, X., Kenyon, W.J., Li, Q., Müllberg, J., and Hutt-Fletcher, L.M. (1998). Epstein-Barr Virus Uses Different Complexes of Glycoproteins gH and gL To Infect B Lymphocytes and Epithelial Cells. *J Virol* 72, 5552–5558.
- Wanzel, M., Herold, S., and Eilers, M. (2003). Transcriptional repression by Myc. *Trends in Cell Biology* 13, 146–150.
- Wanzel, M., Kleine-Kohlbrecher, D., Herold, S., Hock, A., Berns, K., Park, J., Hemmings, B., and Eilers, M. (2004). Akt and 14-3-3 η regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nature Cell Biology* 7, 30–41.
- Wanzel, M., Russ, A.C., Kleine-Kohlbrecher, D., Colombo, E., Pelicci, P.-G., and Eilers, M. (2008). A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat. Cell Biol.* 10, 1051–1061.
- Watry, D., Hedrick, J.A., Siervo, S., Rhodes, G., Lamberti, J.J., Lambris, J.D., and Tsoukas, C.D. (1991). Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* 173, 971–980.
- Weber, A., Marquardt, J., Elzi, D., Forster, N., Starke, S., Glaum, A., Yamada, D., Defossez, P.-A., Delrow, J., Eisenman, R.N., et al. (2008). Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation. *The EMBO Journal* 27, 1563–1574.
- Wei, N., Serino, G., and Deng, X.-W. (2008). The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends in Biochemical Sciences* 33, 592–600.
- West, M.J., Webb, H.M., Sinclair, A.J., and Woolfson, D.N. (2004). Biophysical and Mutational Analysis of the Putative bZIP Domain of Epstein-Barr Virus EBNA 3C. *J Virol* 78, 9431–9445.
- Westermarck, J., and Kähäri, V.M. (1999). Regulation of matrix metalloproteinase expression

in tumor invasion. *FASEB J.* *13*, 781–792.

Westphal, E.-M., Mauser, A., Swenson, J., Davis, M.G., Talarico, C.L., and Kenney, S.C. (1999). Induction of Lytic Epstein-Barr Virus (EBV) Infection in EBV-Associated Malignancies Using Adenovirus Vectors in Vitro and in Vivo. *Cancer Res* *59*, 1485–1491.

White, R.E., Groves, I.J., Turro, E., Yee, J., Kremmer, E., and Allday, M.J. (2010). Extensive Co-Operation between the Epstein-Barr Virus EBNA3 Proteins in the Manipulation of Host Gene Expression and Epigenetic Chromatin Modification. *PLoS ONE* *5*, e13979.

White, R.E., Rämer, P.C., Naresh, K.N., Meixlsperger, S., Pinaud, L., Rooney, C., Savoldo, B., Coutinho, R., Bödör, C., Gribben, J., et al. (2012). EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J. Clin. Invest.* *122*, 1487–1502.

White, R.E., Wade-Martins, R., and James, M.R. (2001). Sequences Adjacent to oriP Improve the Persistence of Epstein-Barr Virus-Based Episomes in B Cells. *J Virol* *75*, 11249–11252.

Whyte, P., Williamson, N.M., and Harlow, E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* *56*, 67–75.

Woisetschlaeger, M., Jin, X.W., Yandava, C.N., Furmanski, L.A., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1991). Role for the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 in viral promoter switching during initial stages of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 3942–3946.

Woisetschlaeger, M., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1989). Mutually exclusive use of viral promoters in Epstein-Barr virus latently infected lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 6498–6502.

Woisetschlaeger, M., Yandava, C.N., Furmanski, L.A., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1990). Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 1725–1729.

Wu, D.Y., Kalpana, G.V., Goff, S.P., and Schubach, W.H. (1996). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *J Virol* *70*, 6020–6028.

Wu, D.Y., Krumm, A., and Schubach, W.H. (2000a). Promoter-Specific Targeting of Human SWI-SNF Complex by Epstein-Barr Virus Nuclear Protein 2. *J Virol* *74*, 8893–8903.

Wu, H., Ceccarelli, D.F.J., and Frappier, L. (2000b). The DNA segregation mechanism of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *EMBO Rep* *1*, 140–144.

Wu, H., Kapoor, P., and Frappier, L. (2002). Separation of the DNA Replication, Segregation, and Transcriptional Activation Functions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1. *J. Virol.* *76*, 2480–2490.

Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M.J., Lehr, N. von der, Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., and Larsson, L.-G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* *22*, 351–360.

- Wu, Z., Zheng, S., and Yu, Q. (2009). The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 2389–2397.
- Wysokenski, D.A., and Yates, J.L. (1989). Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *J Virol* *63*, 2657–2666.
- Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S., and Piwnica-Worms, H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* *14*, 8420.
- Yalamanchili, R., Tong, X., Grossman, S., Johannsen, E., Mosialos, G., and Kieff, E. (1994). Genetic and Biochemical Evidence That EBNA 2 Interaction with a 63-kDa Cellular GTG-Binding Protein Is Essential for B Lymphocyte Growth Transformation by EBV. *Virology* *204*, 634–641.
- Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y., Shimizu, N., and Yamamoto, N. (2000). Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett.* *484*, 153–158.
- Yang, L., Aozasa, K., Oshimi, K., and Takada, K. (2004). Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded RNA Promotes Growth of EBV-Infected T Cells Through Interleukin-9 Induction. *Cancer Res* *64*, 5332–5337.
- Yates, J., Warren, N., Reisman, D., and Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 3806–3810.
- Yates, J.L., Camiolo, S.M., and Bashaw, J.M. (2000). The Minimal Replicator of Epstein-Barr Virus oriP. *J Virol* *74*, 4512–4522.
- Yates, J.L., and Guan, N. (1991). Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. *J Virol* *65*, 483–488.
- Yates, J.L., Warren, N., and Sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* *313*, 812–815.
- Yeh, E.T., Gong, L., and Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene* *248*, 1–14.
- Yenamandra, S., Hellman, U., Kempkes, B., Darekar, S., Petermann, S., Sculley, T., Klein, G., and Kashuba, E. (2010). Epstein-Barr virus encoded EBNA-3 binds to vitamin D receptor and blocks activation of its target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences* *67*, 4249–4256.
- Yenamandra, S.P., Sompallae, R., Klein, G., and Kashuba, E. (2009). Comparative analysis of the Epstein-Barr virus encoded nuclear proteins of EBNA-3 family. *Computers in Biology and Medicine* *39*, 1036–1042.
- Yi, F., Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Knight, J.S., Cai, Q., Choudhuri, T., and Robertson, E.S. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C targets p53 and modulates its transcriptional and apoptotic activities. *Virology* *388*, 236–247.

- Yip, C.K., Berscheminski, J., and Walz, T. (2010). Molecular architecture of the TRAPPII complex and implications for vesicle tethering. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 1298–1304.
- Yokoyama, A., Tanaka, M., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M., Kawasaki, H., Hirano, H., Kitabayashi, I., Ohki, M., Hirai, K., et al. (2001). Identification of Major Phosphorylation Sites of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Leader Protein (EBNA-LP): Ability of EBNA-LP To Induce Latent Membrane Protein 1 Cooperatively with EBNA-2 Is Regulated by Phosphorylation. *J Virol* 75, 5119–5128.
- Yoshiyama, H., Imai, S., Shimizu, N., and Takada, K. (1997). Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol* 71, 5688–5691.
- Young, L., Alfieri, C., Hennessy, K., Evans, H., O'Hara, C., Anderson, K.C., Ritz, J., Shapiro, R.S., Rickinson, A., and Kieff, E. (1989). Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N. Engl. J. Med.* 321, 1080–1085.
- Young, L.S., Dawson, C.W., Clark, D., Rupani, H., Busson, P., Tursz, T., Johnson, A., and Rickinson, A.B. (1988). Epstein—Barr Virus Gene Expression in Nasopharyngeal Carcinoma. *J Gen Virol* 69, 1051–1065.
- Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein—Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer* 4, 757–768.
- Young, P., Anderton, E., Paschos, K., White, R., and Allday, M.J. (2008). Epstein—Barr virus nuclear antigen (EBNA) 3A induces the expression of and interacts with a subset of chaperones and co-chaperones. *J Gen Virol* 89, 866–877.
- Yu, Z.K., Gervais, J.L., and Zhang, H. (1998). Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11324–11329.
- Yue, W., Davenport, M.G., Shackelford, J., and Pagano, J.S. (2004). Mitosis-Specific Hyperphosphorylation of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 Suppresses Its Function. *J Virol* 78, 3542–3552.
- Yue, W., Gershburg, E., and Pagano, J.S. (2005). Hyperphosphorylation of EBNA2 by Epstein-Barr Virus Protein Kinase Suppresses Transactivation of the LMP1 Promoter. *J Virol* 79, 5880–5885.
- Yue, W., Shackelford, J., and Pagano, J.S. (2006). cdc2/Cyclin B1-Dependent Phosphorylation of EBNA2 at Ser243 Regulates Its Function in Mitosis. *J Virol* 80, 2045–2050.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E., and Kenney, S. (1996). Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9194–9199.
- Zargar, Z., and Tyagi, S. (2012). Role of Host Cell Factor-1 in cell cycle regulation. *Transcription* 3,.

- Zetterberg, H., Stenglein, M., Jansson, A., Ricksten, A., and Rymo, L. (1999). Relative Levels of EBNA1 Gene Transcripts from the C/W, F and Q Promoters in Epstein-Barr Virus-Transformed Lymphoid Cells in Latent and Lytic Stages of Infection. *J Gen Virol* 80, 457–466.
- Zhang, J., Bao, S., Furumai, R., Kucera, K.S., Ali, A., Dean, N.M., and Wang, X.-F. (2005). Protein Phosphatase 5 Is Required for ATR-Mediated Checkpoint Activation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9910–9919.
- Zhang, X.-C., Chen, J., Su, C.-H., Yang, H.-Y., and Lee, M.-H. (2008). Roles for CSN5 in control of p53/MDM2 activities. *J. Cell. Biochem.* 103, 1219–1230.
- Zhao, B., Mar, J.C., Maruo, S., Lee, S., Gewurz, B.E., Johannsen, E., Holton, K., Rubio, R., Takada, K., Quackenbush, J., et al. (2010). Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen 3C Regulated Genes in Lymphoblastoid Cell Lines. *PNAS*.
- Zhao, B., Marshall, D.R., and Sample, C.E. (1996). A conserved domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigens 3A and 3C binds to a discrete domain of Jkappa. *J Virol* 70, 4228–4236.
- Zhao, B., and Sample, C.E. (2000). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Activates the Latent Membrane Protein 1 Promoter in the Presence of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 through Sequences Encompassing an Spi-1/Spi-B Binding Site. *J Virol* 74, 5151–5160.
- Zhao, N., Wang, J., Cui, Y., Guo, L., and Lu, S.-H. (2004). Induction of G1 cell cycle arrest and P15INK4b expression by ECRG1 through interaction with Miz-1. *Journal of Cellular Biochemistry* 92, 65–76.
- Ziegelbauer, J., Shan, B., Yager, D., Larabell, C., Hoffmann, B., and Tjian, R. (2001). Transcription Factor MIZ-1 Is Regulated via Microtubule Association. *Molecular Cell* 8, 339–349.
- Ziegelbauer, J., Wei, J., and Tjian, R. (2004). Myc-interacting protein 1 target gene profile: A link to microtubules, extracellular signal-regulated kinase, and cell growth. *PNAS* 101, 458–463.
- Zimber-Strobl, U., Kremmer, E., Grässer, F., Marschall, G., Laux, G., and Bornkamm, G.W. (1993). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter. *EMBO J* 12, 167–175.
- Zimber-Strobl, U., Strobl, L.J., Meitinger, C., Hinrichs, R., Sakai, T., Furukawa, T., Honjo, T., and Bornkamm, G.W. (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *The EMBO Journal* 13, 4973.
- Zimber-Strobl, U., Suentzenich, K.O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G.M., and Bornkamm, G.W. (1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J Virol* 65, 415–423.
- Zuo, Z., Dean, N.M., and Honkanen, R.E. (1998). Serine/threonine protein phosphatase type 5 acts upstream of p53 to regulate the induction of p21(WAF1/Cip1) and mediate growth arrest. *J. Biol. Chem.* 273, 12250–12258.

Zuo, Z., Urban, G., Scammell, J.G., Dean, N.M., McLean, T.K., Aragon, I., and Honkanen, R.E. (1999). Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest. *Biochemistry* 38, 8849–8857.

Annexe : Article supplémentaire

Article supplémentaire : Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs.

La protéine EB2 est une protéine précoce du cycle productif d'EBV. Cette protéine interagit avec l'ARN et permet l'accumulation cytoplasmique de certains ARN messagers viraux précoces et tardifs produits à partir de gènes dépourvus d'introns. EB2 est une protéine liant l'ARN dont l'expression influence la stabilité, l'épissage, l'export nucléaire ainsi que la traduction de ses ARN messagers cibles. Afin de mieux comprendre les fonctions de la protéine EB2, nous avons cherché de nouveaux partenaires cellulaires par la technique du deux-hybrides en levure. Les différents cribles effectués nous ont permis d'identifier trois protéines SR : SF2/ASF, 9G8 et SRp20, comme des partenaires cellulaires de la protéine virale EB2. Ces trois protéines SR sont impliquées dans la régulation de l'épissage, ainsi que dans l'export et la traduction des ARNm cellulaires

Ces trois interactants ont dans un premier temps été validés *in vivo* par co-immunoprécipitation en cellules HEK293T ainsi qu'*in vitro* par GST-pull down. Ensuite, puisque l'un des principaux rôles de la protéine EB2, lors du cycle productif, est de stimuler l'accumulation cytoplasmique d'ARNm viraux précoces et tardifs sans intron, nous avons testé l'importance de l'interaction entre EB2 et les protéines SR sur l'accumulation d'ARNm sans intron. L'utilisation de siARN, dans le but d'inhiber l'expression des protéines SR, nous a permis de montrer que SRp20 joue un rôle essentiel dans l'absence d'accumulation cytoplasmique de différents ARNm cibles de la protéine virale EB2. En effet, l'inhibition de SRp20 résulte en l'augmentation de l'accumulation de ces ARNm. L'effet observé est le même en absence ou en présence d'EB2, signifiant qu'EB2 fonctionne en inhibant SRp20. Enfin, en utilisant la technique d'immunoprécipitation d'ARN, nous avons montré qu'EB2 augmente l'association de SRp20 sur l'ARN, suggérant qu'EB2 agit en stabilisant l'interaction de la protéine cellulaire SRp20 sur l'ARN tout en bloquant son effet négatif sur l'accumulation de cet ARNm dans le cytoplasme des cellules.

J'ai initié ces travaux au début de ma thèse par la réalisation d'un crible deux-hybrides ainsi que la validation *in vivo* et *in vitro* des interactions entre EB2 et certains des partenaires cellulaires identifiés lors de ce crible. Ce travail a ensuite été poursuivi par Franceline Juillard et Fabrice Mure pour l'étude fonctionnelle des interactions entre EB2 et les protéines SR.

Epstein–Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs

Franceline Juillard^{1,2,3}, Quentin Bazot^{1,2,3}, Fabrice Mure^{1,2,3}, Lionel Tafforeau^{3,4},
Christophe Macri^{1,2,3}, Chantal Rabourdin-Combe^{3,4}, Vincent Lotteau^{3,4},
Evelyne Manet^{1,2,3,*} and Henri Gruffat^{1,2,3,*}

¹INSERM U758, Unité de Virologie Humaine, 69364 Lyon, France, ²Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69364 Lyon, France, ³Université de Lyon, 69361 Lyon, France and ⁴INSERM U851, IMAP Team, 69365 Lyon, France

Received January 4, 2012; Revised March 19, 2012; Accepted March 23, 2012

ABSTRACT

The Epstein–Barr Virus (EBV) protein EB2 (also called Mta, SM and BMLF1), is an essential nuclear protein produced during the replicative cycle of EBV. EB2 is required for the efficient cytoplasmic accumulation of viral mRNAs derived from intronless genes. EB2 is an RNA-binding protein whose expression has been shown to influence RNA stability, splicing, nuclear export and translation. Using a yeast two-hybrid screen, we have identified three SR proteins, SF2/ASF, 9G8 and SRp20, as cellular partners of EB2. Then, by using siRNA to deplete cells of specific SR proteins, we found that SRp20 plays an essential role in the processing of several model mRNAs: the Renilla luciferase reporter mRNA, the human β -globin cDNA transcript and two EBV late mRNAs. These four mRNAs were previously found to be highly dependent on EB2 for their efficient cytoplasmic accumulation. Here, we show that SRp20 depletion results in an increase in the accumulation of these mRNAs, which correlates with an absence of additive effect of EB2, suggesting that EB2 functions by antagonizing SRp20. Moreover, by using RNA-immunoprecipitation assays we found that EB2 enhances the association of SRp20 with the β -globin transcript suggesting that EB2 acts by stabilizing SRp20's labile interactions with the RNA.

INTRODUCTION

In eukaryotic cells, nuclear export of mRNAs is mediated by conserved proteins which coat the nascent RNA co-transcriptionally to form export-competent mRNPs that are capped at their 5'-end, spliced, and cleaved/polyadenylated at their 3'-end [for a review, see (1)]. Translocation of mRNPs through the nuclear pore complex requires binding of a heterodimer composed of NXF1 and NXT1 (respectively Mex67 and Mtr2 in *Saccharomyces cerevisiae*), which escorts competent mRNPs out of the nucleus via direct interactions with nucleoporins lining the nuclear pore. Because of its low affinity for binding mRNAs, the heterodimer NXF1:NXT1 requires adaptator proteins, amongst which the best characterized is REF (2). In higher eukaryotes the recruitment of NXF1:NXT1 to mature mRNAs appears to be dependent upon 5'-cap addition and splicing. Two multiprotein complexes are known to be recruited as a consequence of splicing: the exon-junction complex (EJC) which is deposited 20–24 nt upstream of the exon–exon junction during splicing and which is associated with nonsense-mediated mRNA decay (NMD), and the human transcription/export complex (hTREX). hTREX contains the hTHO-complex (composed of hHpr1, hTho2, fSAP79, fSAP35 and fSAP24) associated with the RNA helicase UAP56 and the adaptator protein REF. Recent studies strongly suggest that the cap-binding protein CBP80 and factors deposited at the first exon–exon junction by splicing, cooperate to recruit hTREX onto spliced mRNAs (3). The presence of REF in this complex is

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 472 728 955; Fax: +33 472 728 137; Email: henri.gruffat@ens-lyon.fr
Correspondence may also be addressed to Evelyne Manet. Tel: +33 472 72 81 76; Fax: +33 472 72 80 80; Email: evelyne.manet@ens-lyon.fr

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first three authors should be regarded as joint First Authors.

© The Author(s) 2012. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

thought to stimulate the recruitment of NXF1 onto the mRNPs and lead to their efficient export through the nuclear pore.

For mRNAs generated from intronless genes, two export pathways have been described. One implicates binding of SR proteins 9G8 and SRp20 to mRNAs (4). Similarly to REF, these two shuttling SR proteins have been found to serve as RNA-binding adaptors for NXF1 (5). The other pathway implicates recruitment of REF at the 5'-end of the mRNA by the cap-binding protein CBP20 (6).

In contrast to the majority of mammalian genes, most herpesvirus early and late genes are intronless. The efficient cytoplasmic accumulation of most of these intronless viral mRNAs appears to be strictly dependent on a viral gene product that shares properties with known mRNA export adaptors. The most studied of these factors are the herpes simplex virus type 1 (HSV1) protein ICP27 (7,8), the cytomegalovirus (CMV) protein UL69 (9), the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV) protein ORF57 (10,11), the herpes virus saimiri (HVS) protein ORF57 (12), the Varicella-Zoster virus (VZV) protein IE4 (13) and the Epstein-Barr virus (EBV) protein EB2 (also known as BMLF1, SM and Mta) (14,15). The EB2 protein of EBV is absolutely required for production of infectious viral particles (16). It binds RNA *in vitro* and *in vivo* via an arginine-rich region (17) and induces the cytoplasmic accumulation of most early and late viral mRNAs (16,18,19) both by interacting with cellular adaptors of the NXF1/NXT1 receptor pathway such as REF (20) or OTT1/RBM15 and OTT3/RBM15b (21), two RNA-binding proteins that belong to the human Spen (split end) protein family (22,23), and by directly interacting with NXF1 (24). Like cellular mRNA export factors, EB2 shuttles between the nucleus and the cytoplasm (14,20,24) and we have recently shown that it associates with polyribosomes and strongly stimulates translation of its target mRNAs (25). Moreover, it has recently been shown that EB2/SM modulates splice site selection of the host-cell STAT1 pre-mRNA by directly interacting with the cellular splicing factor SRp20 (26,27).

In order to better understand the mechanisms involved in the multiple functions of EB2, both in viral mRNA processing and translation, we used a wide yeast two-hybrid screen to identify the principal interactions of EB2 with the cellular proteome. Interestingly, we found specific interactions with three members of the SR protein family: SF2/ASF (SRSF1), SRp20 (SRSF3) and 9G8 (SRSF7). The SR protein family comprises a number of phylogenetically conserved and structurally related proteins. They have a common organization with the presence of one or two RNA recognition motifs (RRMs) at their N-termini that provide RNA-binding specificity, and a domain rich in arginine and serine dipeptides, termed the RS domain, at their C-termini. SR proteins have specific, yet degenerate RNA-binding sites. They were originally identified due to their activities as constitutive and alternative pre-mRNA splicing factors [for a review see (28,29)]. However, a subset of SR proteins, which includes SF2/ASF, SRp20 and 9G8, has been found to play additional roles in RNA processing. For

example, SF2/ASF has been implicated in mRNA translation of an ESE (exonic splicing enhancer)-containing luciferase reporter (30,31), SRp20 has been shown to function in IRES (internal ribosome entry site)-mediated translation of viral RNA (32) and 9G8 in translation of un-spliced mRNA containing a CTE (constitutive transport element) (33). Moreover, SRp20 and 9G8 have been found to function in the nucleocytoplasmic export of mRNA by interacting with the mRNA nuclear export factor NXF1 (4,5).

After confirming the interactions found in the two-hybrid screen between EB2 and the three SR proteins by GST-pull-down and co-immunoprecipitation assays, we have studied the impact of depletion of these SR proteins from cells for the EB2-dependent cytoplasmic accumulation of two model transcripts generated from intronless reporter genes as well as two late viral mRNAs and virus particle production. Our results have led us to propose a new mechanism by which a viral protein enhances mRNA accumulation by antagonizing the action of SR proteins.

MATERIALS AND METHODS

Human lymphoblastoid cell cDNA library

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were freshly isolated by density-gradient centrifugation using Ficoll Hypaque (Sigma). B cells were purified from the PBMCs using anti-CD19 coated nanoparticules (EasySep, Stem Cell Technologies). Purified B cells were infected with a recombinant EBV expressing GFP as previously described (34) and infected cells were selected by hygromycin treatment. After several weeks in culture the resulting immortalized cells were used to generate a cDNA library in pACT2-GW (Invitrogen) (1.33×10^7 primary clones).

Plasmids

ORFs for full-length EB2, EB2Nter (amino acids 1–184) and EB2Cter (amino acids 185–479) were cloned in a Gateway recombinational cloning system (35) and deposited in a viral ORF repository, viralORFeome (36). Each ORF was PCR-amplified (with KOD polymerase, Novagen) using *attB1* and *attB2* recombination sites fused to forward and reverse primers, then cloned into pDONR207 (BP Clonase, Invitrogen). The ORFs were subsequently transferred (LR Clonase, Invitrogen) into the bait vector, pGBKT7, to be expressed as Gal4-DB fusions in yeast. Plasmids pCI-FlagEB2, pCI-FlagEB2Nter, pCI-FlagEB2Cter, pCI-FlagEB2 M1.2, pCI-FlagEB2Nter M1.2, pGEX-EB2Nter and pGEX-EB2Cter have been previously described (20,37). pGEX-SRp20, pGEX-9G8, pGEX-SF2/ASF have also been previously described (13). pGEX-SRp20 RRM was constructed by insertion of a stop codon at position 104 in pGEX-SRp20 by site-directed mutagenesis (QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene). pGEX-SRp20 RS was generated by cloning a PCR-amplified SRp20 fragment into the pDEST15 vector (Invitrogen) using Gateway technology (Invitrogen). pDEST-MycNXF1 was generated by cloning a PCR-amplified fragment

into the pDEST-Myc vector (Invitrogen) using Gateway technology (Invitrogen). Expression plasmids for HA-SRp20, V5-SRp20, V5-9G8 and V5-SF2/ASF have been previously described (13) as well as plasmid pcDNAGlobinRen (25). Plasmids $\beta 1(-)2(-)$, 1X- β G, 2X- β G and 4X- β G were a kind gift from Dr Y. Huang. Plasmid pCI-FlagBFRF3-i has been previously described (18). Plasmid pCI-FlagBDLF1-i was constructed in a similar way to pCI-FlagBFRF3-i.

Yeast two-hybrid screens

The screens were performed by yeast mating using the AH109 and Y187 yeast strains (Clontech) (38,39). Bait vectors, pGBKT7-EB2, pGBKT7-EB2Nter, pGBKT7-EB2Cter were transformed into AH109 (bait strain), and the human lymphoblastoid cell line AD-cDNA library was transformed into Y187 (prey strain). Single bait strains were mated with prey strain and then diploids were plated on SD-W-L-H + 5 mM 3-AT medium. Positive clones were maintained on this selective medium for 15 days to eliminate any contaminating AD-cDNA plasmid (40). AD-cDNAs were amplified by colony PCR and inserts were sequenced and identified by automatic BLAST as previously described (41). All primary positive clones were then retested in fresh yeast: bait vectors were retransformed in the AH109 strain and PCR-amplified prey cDNA (for each identified putative interactor) was transformed in the Y187 strain in combination with linearized pACT2 prey vector [gap repair (42)]. All prey strains were then mated with the different bait strains in an 'all against all' fashion, generating a Y2H pairwise matrix.

Cell culture and transfections

HeLa cells and HEK293T cells were grown at 37°C in DMEM supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS) and penicillin-streptomycin. HEK293 cells infected with the recombinant EBV virus (HEK293_{EBV}), a gift from Dr W. Hamerschmidt, have been described previously (43). The recombinant virus encodes Green Fluorescent Protein (GFP) and the hygromycin B resistance gene. HEK293_{EBV-BMLF1KO} has been previously described (16). HEK293_{EBV} and HEK293_{EBV-BMLF1KO} cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10% FBS, penicillin-streptomycin and hygromycin B (100 µg/ml; Invitrogen). Raji cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and penicillin-streptomycin. Plasmid transfections were performed either by the calcium phosphate precipitate method or by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. siRNA were transfected by using INTERFERin (Polyplus Transfection) 48 h prior to DNA transfections. siRNA oligonucleotide sequences used are as follows: 5'-GGAAUAGAAGACAGUUU G(dT)(dT)-3' and antisense for the SRp20 siRNA (32); 5'-AGGAGAGUUAGAAAGGGCU(dT)(dT)-3' and antisense for the 9G8 siRNA (44); 5'-CCAAGGACAU UGAGGACGU(dT)(dT)-3' and antisense for the SF2/

ASF siRNA (44). Firefly luciferase siRNAs were used as a control.

Virus production and titration

HEK293_{EBV} cells or HEK293_{EBV-BMLF1KO} cells were transfected with pCMV-BZLF1, an expression vector coding for the EBV transcriptional activator EB1 (also called Zta or Zebra), to activate the EBV productive cycle. Supernatants from transfected cells were harvested at 48 h post-transfection and filtered through a 0.45 µm pore size filter. Raji cells (1×10^5) were incubated in 0.5 ml of virus solution for 6–8 h at 37°C in a 24-well plate. Cells were then washed, re-suspended in 1 ml of RPMI and incubated for an additional 72 h at 37°C. GFP-expressing Raji cells were quantified by FACS analysis.

Co-immunoprecipitation assays and western blots

Transfected HEK293T cells were harvested from 100-mm dishes 48 h post-transfection and lysed in IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT and 0.5% Nonidet P-40) plus protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals) and phosphatase inhibitors (Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, Sigma-Aldrich). For immunoprecipitation of the transiently expressed F.EB2 protein, cell extracts were incubated with 30 µl anti-Flag M2 affinity gel (Sigma) for 4 h at 4°C and immunopurified proteins were analysed by western blotting. Antibodies used for western blotting analysis were an anti-Flag rabbit polyclonal antibody (Sigma), an anti-V5 rabbit polyclonal antibody (Sigma), an anti-SRp20 mAb (clone 7B4, Invitrogen), an anti-9G8 rabbit polyclonal antibody (Sigma), an anti-SF2/ASF mAb (clone 96, Invitrogen) and an anti- α -Tubulin mAb (B-5-1-2, Sigma). The appropriate anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies (GE healthcare) were used as secondary antibodies. Myc-tagged proteins were revealed using a c-Myc (9E10) HRP-conjugated antibody (Santa Cruz). RNase treatment was performed by adding 2 µl of RNase A (10 mg/ml) to each reaction. Western blots were revealed using ECL (Pierce).

In vitro GST pull-down assays

GST and GST-fusion proteins were purified from *Escherichia coli* BL21 (DE3) codon plus strain extracts, with glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences). Beads carrying the GST or the GST-fusion proteins were equilibrated in TNTB-binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 0.1% NP40 and 2 mg/ml BSA) in the presence of protease inhibitors (complete EDTA-free cocktail from Roche Molecular Biochemicals) and incubated with radiolabelled proteins synthesized *in vitro* in the presence of [³⁵S]-methionine using the TnT-Coupled Transcription/Translation system (Promega), in TNTB for 4 h at 4°C. RNase treatment was performed by adding 1 µl of RNase A (10 mg/ml) and 1 µl of RNase T1 (10 U/µl) in the incubation reaction. Beads were washed 5× in TNTB buffer without BSA and bound

proteins were fractionated by SDS–PAGE and revealed by autoradiography

Immunofluorescence assays

For indirect immunofluorescence experiments, an anti-Flag polyclonal antibody (Sigma) and an anti-HA mAb (Sigma) were used as primary antibodies. Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody (Invitrogen) and a Fluorolink Cy3-labelled goat anti-mouse IgG (H+L) (GE Healthcare) were used as secondary antibodies. Cell nuclei were stained by incubation with 5 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma).

RT–PCR amplifications and RNA immunoprecipitations

RNA extractions, quantitative reverse transcription PCR (RT–qPCR) from nuclear and cytoplasmic RNAs were performed as previously described (25). For semi-quantitative RT–PCR, RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen). Any contaminating DNA was removed from RNA samples using RQ1 DNase (Promega). RT–PCR was then performed using the qScript cDNA SuperMix from Quanta (RT) and GoTaq DNA polymerase (Promega) (PCR) in the presence of [α -³²P]-dCTP. The following primer pairs were used to amplify the human β -globin mRNA: 5'-CATTTGCTTCTGACACAAGT-3' and 5'-GCAGAATCCAGATGCTCAAGG-3'. β -actin, BDLF1 and BFRF3 PCR primers have been previously described (18,25). PCRs were performed on various amounts of the RT reaction mixtures to obtain a linearly increasing signal after 25 cycles. The number of PCR cycles used in all subsequent assays was 25. PCR fragments were analysed on 6% polyacrylamide gels and data were quantified by scanning the gels with a PhosphorImager. RNA immunoprecipitations were realized using the following protocol [modified from Boyne *et al.* (45)]. HeLa cells were washed with ice-cold PBS and UV-irradiated at 900 mJ/cm² in a Bio-Link crosslinker (Vilbert-Lourmat). Cells were scraped, transferred to an RNase-free tube and pelleted at 1200 rpm for 5 min. Cell pellets were re-suspended in 400 µl of TAP lysis buffer (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5% Nonidet P-40, 5% glycerol, protease inhibitors [Roche Molecular Biochemicals], 1 µl/ml RNasin (Promega)). Cells were incubated on ice for 30 min with occasional vortexing to lyse cells. For immunoprecipitations, protein A-Sepharose beads were prepared, coupled either to anti-SRp20 monoclonal antibody (Invitrogen) or anti-Flag M2 monoclonal antibody (Sigma). The antibody-coated beads were incubated with the cleared cell lysates for 4 h at 4°C. Beads were then washed 5× with NT2 buffer [50 mM Tris–HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05% Nonidet P-40, 1 µl/ml RNasin (Promega)], and RNA was eluted by heating at 55°C for 15 min in 100 µl NT2 buffer containing 0.1% SDS and 0.5 µg/ml proteinase K. Beads were pelleted, and the supernatant transferred to a fresh RNase-free tube. RNA was then extracted and analysed as described above.

RESULTS

Identification of the three SR proteins, 9G8, SF2/ASF and SRp20 as specific interactors of the EBV EB2 protein in a yeast two-hybrid screen

We used the yeast two-hybrid (Y2H) system to identify cellular proteins that interact with EB2. Three constructs, encoding full length, N-terminal half (amino acids 1–184) or C-terminal half (amino acids 185–479) of EB2 were used to probe a human lymphoblastoid cell line (EBV-infected) cDNA library. Three independent screens were performed with each EB2-derived bait protein by mating. In total, each EB2 construct was screened against $2\text{--}8 \times 10^7$ human AD–Y fusion proteins and 269 clones (corresponding to 64 different putative interactions) were initially characterized following PCR amplification of the cDNAs and sequencing. The data set was retested by direct Y2H between EB2 protein baits and cellular protein preys identified by our Y2H screens (Y2H pairwise matrices). After elimination of autoactivators, 43 Y2H interactors were retested positive (Table 1). From the 269 initial positive colonies, 80 corresponded to an interaction of EB2 with itself via its C-terminal domain. In our list of cellular interactors, only *Sp100* (46) and *RBM15B* (21) have been previously described as direct interactors for EB2. A majority of the newly identified interactors corresponds to proteins involved in RNA metabolism. Among them, we found three members of the highly conserved SR protein family, namely 9G8 (*SFRS7*), SF2/ASF (*SFRS1*) and SRp20 (*SFRS3*). To confirm the interaction between EB2 and the three SR proteins in mammalian cells, we performed co-immunoprecipitation assays. V5-tagged 9G8, SF2/ASF, SRp20—or Myc-tagged NXF1 as a positive control—were expressed in HEK293T cells either alone or together with Flag-tagged EB2. Immunoprecipitations were performed using an M2 anti-Flag mAb affinity gel in the presence or absence of RNase and the immunoprecipitated complexes were analysed by western blotting. As published previously (24), NXF1 was efficiently co-immunoprecipitated with EB2 and the interaction was found to be drastically reduced in the presence of RNase (Figure 1D). Interestingly, 9G8 (panel A), SF2/ASF (panel B) and SRp20 (panel C) were all specifically co-immunoprecipitated with EB2 both in the presence or absence of RNase treatment indicating that all three SR proteins can interact with EB2 in mammalian cells and that these interactions are largely independent of the presence of RNA.

EB2 interacts with 9G8, SF2/ASF and SRp20 via its C-terminal domain

To confirm that EB2 interacts directly with the SR proteins and to identify the region of EB2 that is involved in each interaction, we performed *in vitro* binding assays by using GST fusion proteins produced in bacteria and ³⁵S-proteins that were *in vitro*-translated in reticulocyte lysates. In a first series of experiments, ³⁵S-labelled EB2, EB2Nter or EB2Cter (Figure 2A) were

Table 1. List of cellular proteins interacting with EB2 identified in the Y2H screen

NCBI GeneID	Nb of hits	Gene symbol	Full name
RNA metabolism			
6672	7	<i>SP100</i>	SP100 nuclear antigen
22827	9 ^a	<i>PUF60</i>	Poly-U-binding splicing factor 60 kDa
8175	1	<i>SF3A2</i>	Splicing factor 3a, subunit 2, 66 kDa
6426	3 ^a	<i>SRSF1</i>	Splicing factor, arginine/serine-rich 1
6432	1 ^a	<i>SRSF7</i>	Splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35 kDa
6428	10 ^a	<i>SRSF3</i>	Splicing factor, arginine/serine-rich 3
8233	3	<i>ZRSR2</i>	Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine-rich 2
3183	20 ^a	<i>HNRNPC</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2)
29890	2 ^a	<i>RBM15B</i>	RNA-binding motif protein 15B
Ribosome components			
6138	13	<i>RPL15</i>	Ribosomal protein L15
6129	1	<i>RPL7</i>	Ribosomal protein L7
6142	6	<i>RPL18A</i>	Ribosomal protein 18A
91582	2	<i>RPS19BP1</i>	Ribosomal protein S19-binding protein 1
7311	1	<i>UBA52</i>	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1
Transcriptional regulation			
10743	3	<i>RAI1</i>	Retinoic acid induced 1
30836	1	<i>DNTTIP2</i>	Deoxynucleotidyltransferase, terminal, interacting protein2
3663	8	<i>IRF5</i>	Interferon regulatory factor 5
Ubiquitination			
9636	3	<i>ISG15</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier
7329	4	<i>UBE2I</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homologue, yeast)
Others			
118881	3	<i>COMTD1</i>	Catechol-O-methyltransferase domain containing 1
8525	3	<i>DGKZ</i>	Diacylglycerol kinase ζ 104 kDa
7266	1	<i>DNAJC7</i>	DnaJ (Hsp40) homologue, subfamily C, member 7
4050	5	<i>LTB</i>	Lymphotoxin β (TNF superfamily member 3)
5155	8	<i>PDGFB</i>	sarcoma viral (v-sis oncogene homologue)
6643	2	<i>SNX22</i>	Sorting nexin 2
147	1	<i>ADRA1A</i>	Adrenergic receptor, α -1B-, receptor
Unknown function			
81844	2	<i>TRIM56</i>	Tripartite motif-containing 56
55661	24	<i>DDX27</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 27
79009	1	<i>DDX50</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 50
23518	2	<i>R3HDM1</i>	R3H domain containing 1
51111	1	<i>SUV420H1</i>	Suppressor of variegation 4–20 homologue 1 (<i>Drosophila</i>)
65265	1	<i>C8orf33</i>	Chromosome 8 open reading frame 33
84273	2	<i>C4orf14</i>	Chromosome 4 open reading frame 14
Zinc-finger proteins			
7738	1	<i>ZNF184</i>	Zinc-finger protein 184
63977	1	<i>ZNF298</i>	Zinc-finger protein 298
126295	2	<i>ZNF57</i>	Zinc-finger protein 57
10782	2	<i>ZNF274</i>	Zinc-finger protein 274
79759	1	<i>ZNF668</i>	Zinc-finger protein 668
163049	1	<i>ZNF791</i>	Zinc-finger protein 791
90987	1	<i>ZNF251</i>	Zinc-finger protein 251
55769	1	<i>ZNF83</i>	Zinc-finger protein 83
3104	1	<i>ZBTB48</i>	Zinc-finger and BTB domain containing 48
Viral protein			
5176227	80 ^a	<i>EB2</i>	mRNA export factor EB2

^aconfirmed by coIP *in vivo*.

Each human gene is identified by its National Center for Biotechnology Information (NCBI) gene ID (first column), Gene symbol (third column) and full name (fourth column). The number of independent clones found in the Y2H screen for a given partner is indicated in the second column.

incubated with GST, GST–9G8, GST–SF2/ASF or GST–SRp20 proteins bound to Glutathione Sepharose beads in the presence of RNase. As shown in Figure 2B, EB2 was efficiently retained on GST–9G8, GST–SF2/ASF and GST–SRp20 but not on GST alone, which strongly suggests a direct interaction between EB2 and each of the three SR proteins. When we used the C-terminal half of EB2 (EB2Cter) we observed that this protein was retained on both GST–9G8 and GST–SRp20, but less

efficiently on GST–SF2/ASF. On the contrary, the N-terminal domain of EB2 (EB2Nter) was not retained on GST–9G8 or GST–SRp20, but a weak interaction was detected with GST–SF2/ASF. In a reverse series of experiments, ³⁵S-labelled 9G8, SF2/ASF or SRp20 were incubated with GST, GST–EB2Nter or GST–EB2Cter (Figure 2C). All three proteins were retained on GST–EB2Cter, whereas interaction with GST–EB2Nter was either non-detectable (SRp20) or much

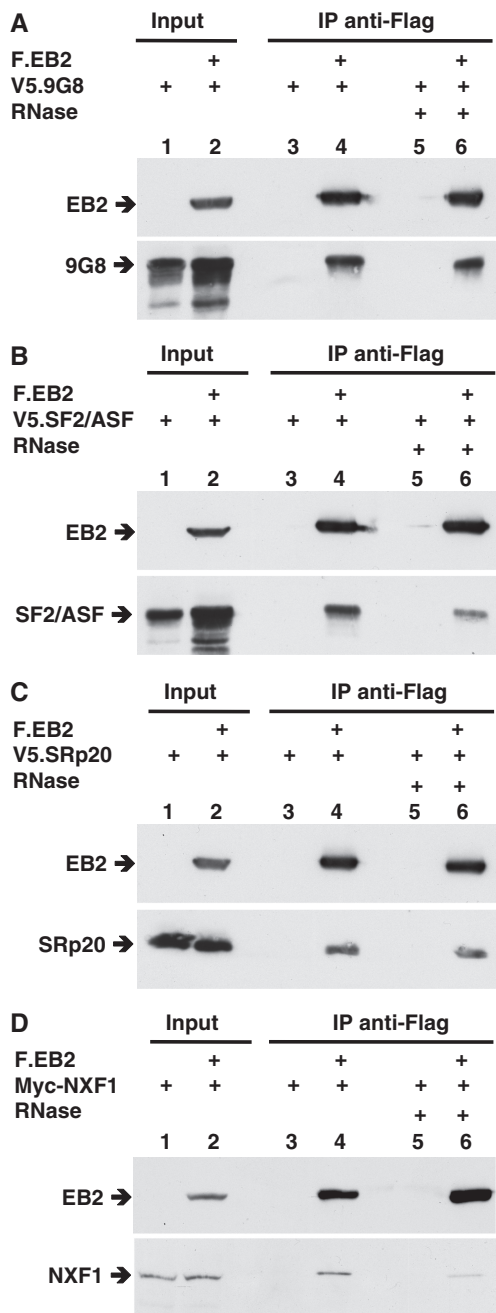


Figure 1. SRp20, 9G8 and SF2/ASF coimmunoprecipitate with EB2. V5-tagged 9G8 (A), V5-tagged SF2/ASF (B), V5-tagged SRp20 (C) or c-Myc-tagged NXF1 (D) were expressed by transient transfection in HEK293T cells either alone or together with Flag-tagged EB2. Lysates were prepared and immunoprecipitations performed using an M2 anti-Flag mAb affinity gel in presence or absence of RNase. The immunoprecipitated complexes were then analysed by western blotting using an anti-Flag polyclonal antibody to visualize EB2, an anti-V5 polyclonal antibody to visualize 9G8, SF2/ASF and SRp20 or an anti-c-Myc monoclonal antibody for NXF1. The 'input' corresponds to 15% of the material present in the immunoprecipitated lysates.

weaker (9G8 and SF2/ASF). From these experiments we conclude that the main interaction domain between EB2 and the three SR proteins is located in its C-terminal half.

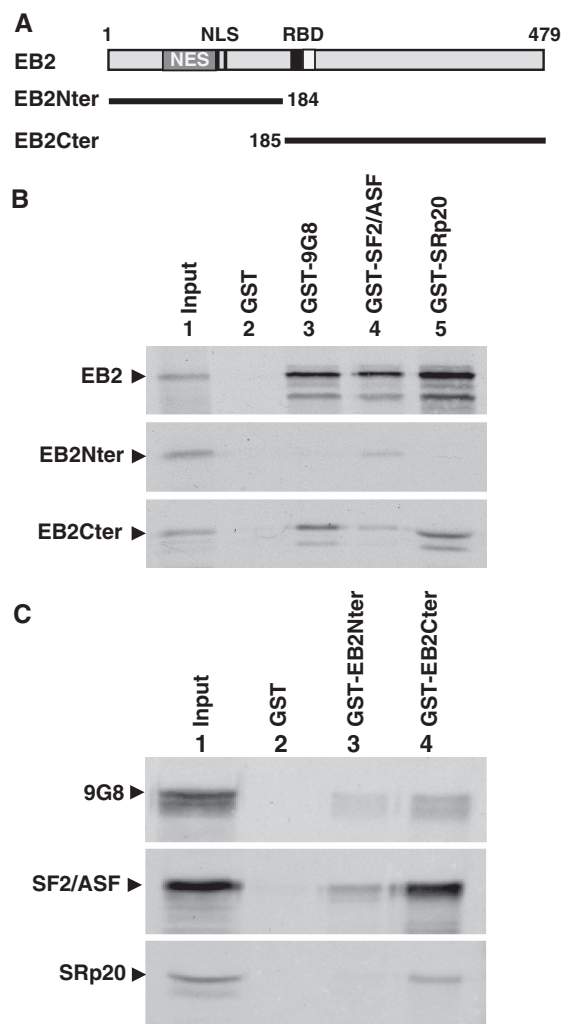


Figure 2. SRp20, 9G8 and SF2/ASF interacts with the C-terminal half of EB2 *in vitro*. (A) Schematic representation of the EB2 protein. The light gray box represents the nuclear export domain (NES) previously identified in the protein, the dark gray box, the RNA-binding domain (RBD), the white box, the REF interacting domain and the two vertical bars the Nuclear Localization Signals (NLS). Below, the C-terminal and N-terminal deletion mutants (EB2Nter and EB2Cter respectively) are represented. (B) ³⁵S-labelled EB2, EB2Nter or EB2Cter were incubated with purified GST, GST-9G8, GST-SF2/ASF or GST-SRp20 bound to glutathione sepharose beads. The bound proteins were analysed by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. In lane 1, the equivalent of one-fifth of the EB2-, EB2Nter- or EB2Cter-expressing rabbit reticulocyte lysate used in each assay was loaded onto the gel. (C) ³⁵S-labelled 9G8, SF2/ASF or SRp20 were incubated with purified GST, GST-EB2Nter or GST-EB2Cter bound to glutathione sepharose beads. The bound proteins were analysed by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. In lane 1, the equivalent of one-fifth of the 9G8-, SF2/ASF- or SRp20-expressing rabbit reticulocyte lysate used in each assay was loaded onto the gel.

We then asked which domain of SRp20 was involved in the interaction with EB2. For this, we generated two GST-SRp20 mutant fusion proteins: one of the fusion protein carries the N-terminal RRM (RRM) domain, the other carries the RS-rich C-terminal domain (Figure 3A). The results (Figure 3B) suggest that the

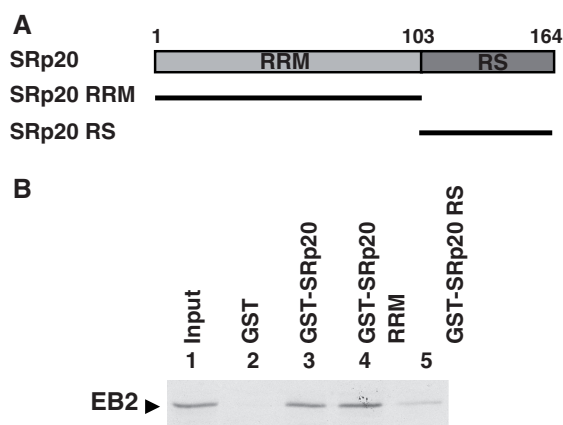


Figure 3. Mapping of the interaction domains of EB2 in SRp20. (A) Schematic representation of SRp20 and deletion mutants. (B) ³⁵S-labelled EB2 was incubated with purified GST, GST-SRp20, GST-SRp20 RRM or GST-SRp20 RS bound to glutathione sepharose beads. The bound proteins were analysed by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. In lane 1, the equivalent of one-tenth of EB2-expressing rabbit reticulocyte lysate used in each assay was loaded onto the gel.

interaction domain of SRp20 with EB2 is located within the first 103 amino acids, which corroborates the finding of Verma *et al.* (27).

Over-expression of SRp20, 9G8 and SF2/ASF induces the nuclear re-localization of cytoplasmic EB2 mutant derivatives

Although SRp20 has been previously described as a shuttling protein, it is mostly detected in the nucleus. EB2—also a shuttling protein—is similarly predominantly found at steady state in the nucleus and we have previously characterized two nuclear localization signals of the protein in its N-terminal half: an EB2 protein with its first 184 amino acids deleted was mostly cytoplasmic. Furthermore, by mutating two sequences—KRRR (NLS1: amino acids 126–130) and KRR (NLS2: amino acids 143–145)—to alanines, the resulting protein, F.EB2 M1.2 was found to be partially cytoplasmic (20). We made use of these EB2 cytoplasmic mutants to ask whether over-expression of nuclear SRp20 in HeLa cells would induce a re-localization of cytoplasmic EB2 mutants into the nucleus. We thus co-expressed HA-tagged SRp20 with each one of the three EB2 mutant proteins depicted in Figure 4A. The respective localization of the proteins was then visualized by immunofluorescence. As shown in Figure 4B, SRp20 was efficiently over-expressed only in a subset of the transfected cells (compare panels a, d and g to panels c, f and i respectively). Interestingly, when we compared the localization of F.EB2 M1.2 between cells over-expressing or not SRp20, we found that F.EB2 M1.2 became fully nuclear in cells over-expressing SRp20 (Figure 4B, panel b). In accordance with this, similar results were obtained when we used the F.EB2Cter protein. This protein, mostly cytoplasmic in cells that did not over-express SRp20, was clearly concentrated in the nuclei of cells over-expressing the SR

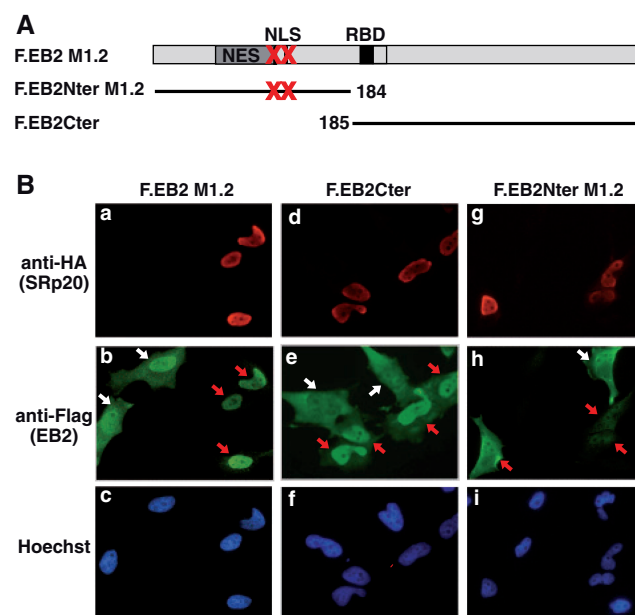


Figure 4. SRp20 over-expression induces retention of an NLS-deficient EB2 protein in the nuclei of HeLa cells. (A) Schematic representation of EB2 and EB2 mutants. (B) HeLa cells were co-transfected with expression vectors for HA-SRp20 and either FlagEB2 M1.2, FlagEB2Cter or FlagEB2Nter M1.2. Proteins were visualized by indirect immunofluorescence using an anti-HA mAb (for detection of HA-SRp20) (panels a, d and g) and an anti-Flag polyclonal antibody (for detection of FlagEB2 protein and mutants as indicated) (panels b, e and h). An Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody and a Fluorolink Cy3-labelled goat anti-mouse IgG (H+L) antibody were used as secondary antibodies respectively. Cell nuclei were stained with Hoechst 33258 (Sigma) (panels c, f and i). Red arrows indicate cells in which SRp20 is over-expressed together with FlagEB2 (or mutant FlagEB2) whereas white arrows indicate cells in which FlagEB2 (or mutant proteins) is expressed but SRp20 is not over-expressed.

protein (Figure 4B, panel e). In order to determine if the translocation of cytoplasmic EB2 into the nucleus was due to a direct interaction with SRp20, we used the F.EB2Nter M1.2 protein, which does not contain the SRp20 interaction domain. Again, due to the mutation of the two NLS sequences, the protein was mostly cytoplasmic. This cytoplasmic localization was not affected by the presence or not, of over-expressed SRp20 (Figure 4B, panel h). Similar results were obtained with both SF2/ASF and 9G8 (data not shown). Taken together, these experiments indicate that EB2 interacts with the three SR proteins within live cells.

Down-regulation of SRp20 expression by siRNA results in a strong inhibition of the EB2-dependent cytoplasmic Renilla luciferase mRNA accumulation

Since we previously reported that EB2 significantly increases the amount of cytoplasmic Renilla luciferase mRNA expressed from an intronless construct (25), we asked whether the SR proteins SRp20, 9G8 or SF2/ASF could play a role in the EB2-dependent cytoplasmic accumulation of this specific mRNA. The Renilla luciferase reporter construct pcDNAGlobinRen (Figure 5A) was thus transfected into HeLa cells, together or not, with

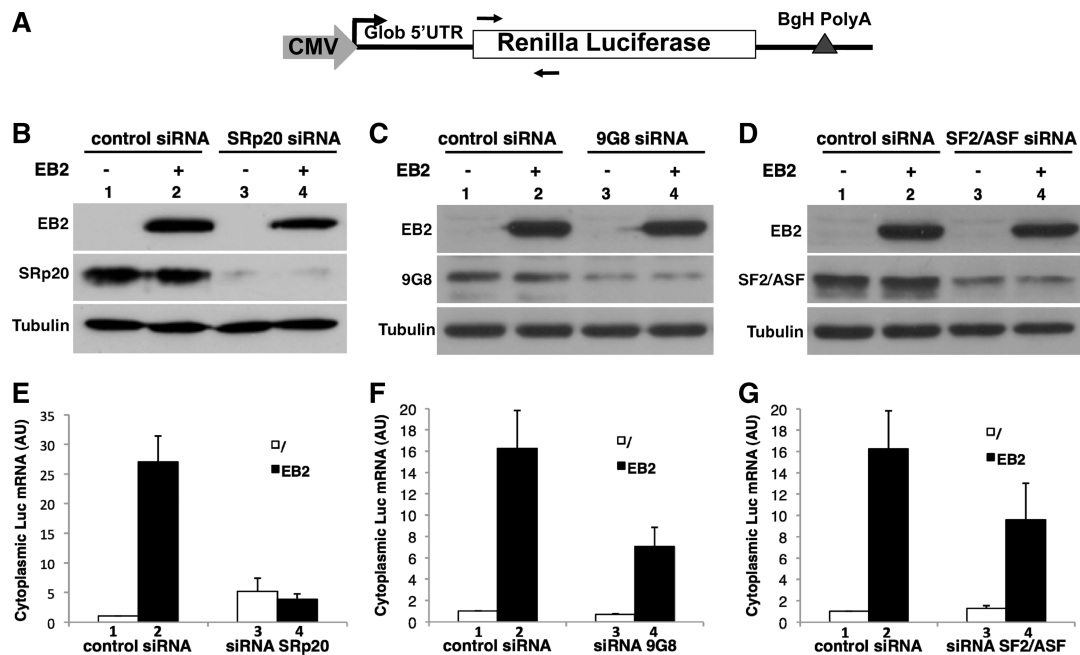


Figure 5. SRp20 is required for the EB2-dependent cytoplasmic accumulation of Renilla luciferase mRNA. (A) Schematic representation of the Renilla luciferase intronless-coding vector (pcDNAGlobinRen) showing positions of the CMV promoter and BgH polyadenylation signal. Small arrows indicate the position of the primers used for the PCR. (B–D) Immunoblots of HeLa cells co-transfected with pcDNAGlobinRen together with pCI-Flag EB2 as indicated in the figure. Cells were previously transfected with either a control siRNA (lanes 1 and 2 of each panel) or an siRNA specific for SRp20 (panel B, lanes 3 and 4), 9G8 (panel C, lanes 3 and 4) or SF2/ASF (panel D, lanes 3 and 4). The blots were either probed with an M2-Flag mAb to detect Flag-EB2, an anti-SRp20 mAb, an anti-9G8, an anti-SF2/ASF, or an anti- α -Tubulin as a control of total protein amounts. (E–G) Quantification of cytoplasmic luciferase encoding mRNAs by RT-qPCR using GAPDH as an internal control. mRNAs were extracted from cells transfected as described in B, C and D respectively. Experiments were made three times and the error bars represent standard deviations.

an expression plasmid for EB2 48 h after transfection of the cells with an siRNA specific for SRp20, 9G8, SF2/ASF or a control siRNA. Both the expression level of EB2 and the efficiency of SRp20, 9G8 or ASF/SF2 down-regulation by the specific siRNAs were verified by western blot analysis as shown in Figure 5B, C and D respectively). The amount of cytoplasmic luciferase mRNA was then quantified by RT-qPCR, normalized to the amount of GAPDH mRNA and plotted on the graphs presented in Figure 5E, F and G as relative mRNA amounts. As we published previously (25), we found that in cells transfected with a control siRNA, the presence of EB2 led to a strong increase (16- to 27-fold) in the amount of Renilla luciferase mRNA (compare lane 2 to lane 1 in panels E, F and G). When we inhibited endogenous SRp20 expression with a specific siRNA, EB2 did not induce any increase in the amount of Renilla luciferase mRNA (compare lane 4 to lane 3 in panel E). However, it should be noted that depletion of SRp20, in the absence of EB2, induced a reproducible increase (on average 5-fold) in the amount of cytoplasmic Renilla luciferase mRNA (compare lane 3 to lane 1 in panel E). The results of concomitant quantification of Renilla luciferase nuclear mRNAs (Supplementary Figure S1) were very similar to those obtained with the cytoplasmic mRNAs: EB2 induced an increase in the amount of nuclear luciferase RNA (10-fold). So did SRp20 depletion by itself (9-fold) and, in this case of SRp20 depletion, EB2 did not increase the amount of nuclear luciferase RNA.

In fact, EB2 rather induced a diminution of nuclear luciferase RNA in the absence of SRp20. This effect of SRp20 depletion on both the amount of nuclear and cytoplasmic Renilla luciferase RNA, suggests that SRp20 targets this specific mRNA and either induces its destabilization or stimulates cryptic splicing, which eliminates part of the luciferase mRNA sequence, including that amplified in our RT-PCR reaction.

Inhibition of either 9G8 or SF2/ASF expression (Figure 5C and D respectively) also affected EB2-mediated cytoplasmic accumulation of Renilla luciferase mRNA, although to a much lower extent. Moreover, in the absence of EB2, depletion of either 9G8 or SF2/ASF did not have any noticeable impact on the level of the Renilla luciferase mRNA (Figure 5F and G). The results of concomitant quantification of the nuclear Renilla luciferase RNAs fully mimicked the results of the quantification obtained with the cytoplasmic mRNAs (data not shown).

Taken together, these results strongly suggest that SR proteins—and in the case of this specific mRNA, in particular SRp20—are required for efficient EB2-dependent cytoplasmic accumulation of its target mRNAs.

EB2 induces efficient cytoplasmic accumulation of human β -globin cDNA transcript in a SRp20-dependent manner

In the Renilla luciferase mRNA model, SRp20 appears to be the main SR protein necessary for EB2-dependent

cytoplasmic accumulation of the mRNA. SRp20 could be necessary, either for the efficient recruitment/stabilization of EB2 to the RNA or on the contrary, SRp20 could be recruited/stabilized onto the RNA by EB2 and participate actively in the stabilization and export of the mRNP. Interestingly, Huang and Steitz previously demonstrated that SRp20 (and 9G8) interacts specifically with a 22-nt RNA element from the mouse histone *H2a* gene (Figure 6A) (4). Insertion of this 22-nt motif, upstream of the human β -globin cDNA sequence in reporter construct $\beta 1(-)2(-)$ (Figure 6B) inhibits cryptic splicing between the β -globin-coding sequence and vector sequences, improves polyadenylation efficiency and enhances nuclear export. These effects increased with the number of tandemly repeated copies of the 22-nt element in a synergistic manner (4). We thus took advantage of these reporter constructs to study the effect of EB2 in relation to the presence of well-identified SRp20/9G8-binding sites. The constructs depicted in Figure 6B were thus used in transient transfections, either alone or together with an expression plasmid for EB2. Cytoplasmic RNA was then isolated and analysed by RT-PCR. As expected from the previous results of Huang and Steitz (4), we observed that the amount of cytoplasmic β -globin mRNA increased with the multimerization of the 22-nt motif (Figure 6C, lanes 1, 3, 5 and 7). Interestingly, although EB2 increased the amount of cytoplasmic β -globin mRNA expressed from the four β -globin constructs (Figure 6C, lane 2), we observed that this effect was inversely proportional to the number of 22-nt motifs present in the reporter constructs (Figure 6C, lanes 2, 4, 6 and 8 and Figure 6D).

We then asked whether the effect of EB2 on the $\beta 1(-)2(-)$ RNA was dependent on SRp20 by reiterating the above experiments in the presence of an anti-SRp20 siRNA or a control siRNA. The data presented in Figure 7, show that the EB2-induced increase in the cytoplasmic accumulation of the β -globin mRNAs expressed from the $\beta 1(-)2(-)$ construct, is strongly dependent on the presence of SRp20. Similarly to what we observed with the Renilla luciferase mRNA, we noted a reproducible increase in the amount of cytoplasmic β -globin mRNA when the cells were depleted of SRp20. This was not due to an indirect effect on the level of transcription initiated at the β -globin promoter since we did not observe any difference in the amount of transcripts generated from the 4 \times - β G construct that contains the 22-nt 'stabilizing' motif (data not shown). We also tested the impact of depleting the cells of either 9G8 or SF2/ASF by siRNA. Similarly to what was observed with the luciferase mRNA, the data, presented in Supplementary Figure S2, show a reproducible diminution of the EB2-dependent cytoplasmic accumulation of the β -globin mRNA upon depletion of 9G8 or SF2/ASF. However, the impact of these depletions on EB2's capacity to induce accumulation of these mRNAs in the cytoplasm is not as drastic as that of SRp20.

Taken together, these data suggest that the effect of EB2 on the cytoplasmic accumulation of the β -globin mRNA is highly dependent on the presence of SRp20 but that rather than being recruited onto the mRNA by

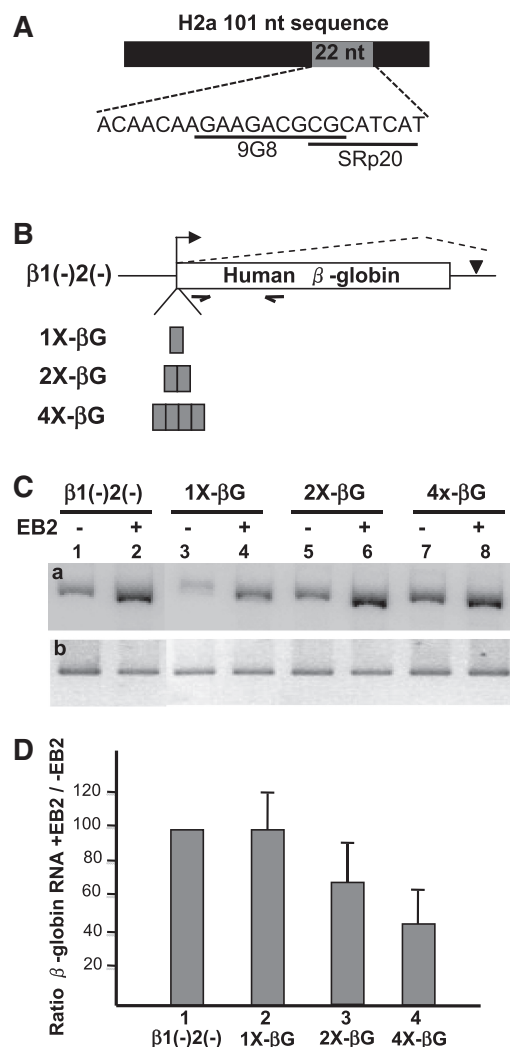


Figure 6. Effect of EB2 on the cytoplasmic accumulation of a human β -globin transcript that carries SRp20-binding sites. (A) Schematic representation of the mouse histone H2a 22-nt element. The black rectangle represents the 101-nt sequence from the mouse histone H2a found to facilitate cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts (47). The 22-nt element is shown with the 9G8 and SRp20-binding sites underlined. (B) Reporter constructs used for measuring the effect of EB2 in transient transfection experiments. The large open rectangle represent the human β -globin cDNA sequence, the black triangle the β -globin polyadenylation signal. An example of cryptic splicing from the human β -globin-coding region to the vector sequence is indicated. The grey boxes represent copies of the 22-nt element inserted at the beginning of the β -globin open reading frame. The two half arrows indicate the oligonucleotides used for RT-PCR amplifications. (C) Autoradiogram of an example of RT-PCR amplification of human β -globin RNAs expressed in transfected cells. The human β -globin plasmids depicted in C were transfected individually into HeLa cells either alone or together with an expression plasmid for EB2 as indicated. Forty-eight hours later, cytoplasmic RNAs were prepared and subjected to RT-PCR using the primer pair indicated in B (panel a) or a primer pair specific for β -actin mRNA as internal control (panel b). (D) Quantification of the results of three experiments. Each band from an experiment similar to that presented in C was quantified by using a PhosphorImager. The data are expressed as a ratio between the amount of cytoplasmic β -globin RNA measured in the presence of EB2 and the amount of cytoplasmic β -globin RNA measured in the absence of EB2. The error bars represent standard deviation.

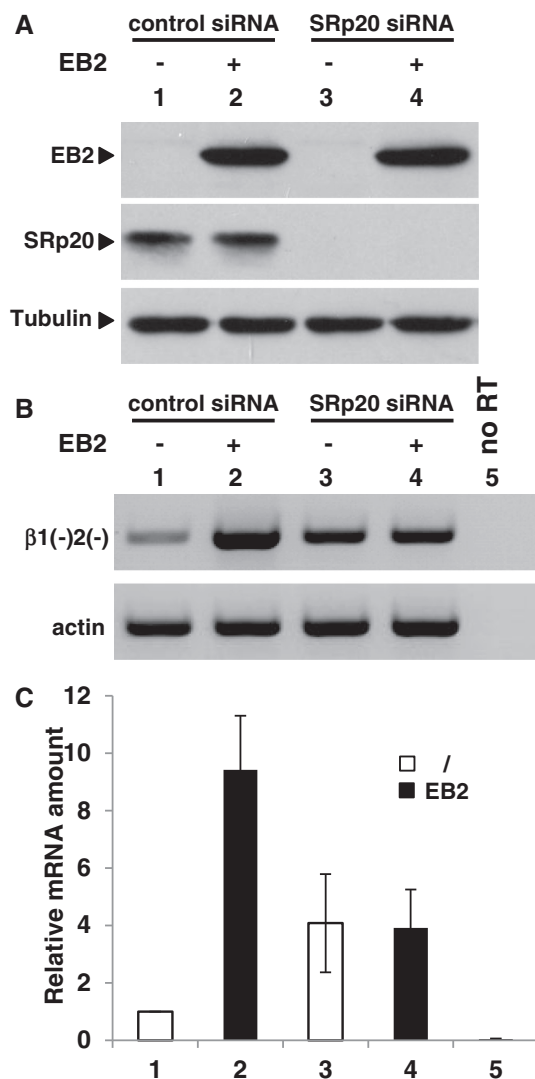


Figure 7. SRp20 is required for the EB2-dependent cytoplasmic accumulation of human β -globin cDNA transcripts. (A) Immunoblots of HeLa cells co-transfected with the $\beta 1(-)2(-)$ reporter construct together with an EB2 expression plasmid as indicated in the figure. Cells were previously transfected with either a control siRNA (lanes 1 and 2) or a siRNA specific for SRp20 (lanes 3 and 4). The blots were probed with either a M2-Flag mAb to detect tagged Flag-EB2, an anti-SRp20 mAb or an anti- α -Tubulin as a control of total protein amounts. (B) Autoradiogram of an example of RT-PCR amplifications of human β -globin RNAs expressed in cells transfected as indicated in A, using the primer pair specific for human β -globin RNA (top panel) or a primer pair specific for actin RNA as internal control (bottom panel). (C) Quantification of the results of three experiments using a PhosphorImager. The error bars represent standard deviation.

specifically bound-SRp20, EB2 might mimic the effect of the 22-nt element by recruiting/stabilizing SRp20 onto the β -globin mRNA.

EB2 increases SRp20 recruitment onto human β -globin RNA

In order to test our above hypothesis that EB2 increases SRp20's binding to β -globin RNA, we performed RNA-immunoprecipitation experiments. For this, HeLa cells, transiently transfected with the $\beta 1(-)2(-)$ reporter

construct either alone or together with increasing amounts of an expression vector for EB2, were UV-irradiated to crosslink proteins to the RNA. SRp20-containing complexes were then immunoprecipitated with a specific anti-SRp20 antibody and RNA prepared from these immunoprecipitated fractions was analysed by RT-PCR. As can be seen in Figure 8A, the amount of $\beta 1(-)2(-)$ RNA co-immunoprecipitated with SRp20 increased proportionally with the amount of EB2 expressed in the cells. We also performed RNA-immunoprecipitation experiments using an anti-Flag antibody to immunoprecipitate Flag tagged-EB2 in the presence or absence of SRp20. Figure 8B shows that the amount of β -globin RNA associated with EB2 remains unchanged when cells are depleted of SRp20. Taken together, these results indicate that EB2 bound to β -globin mRNA either recruits SRp20 onto the RNA or stabilizes SRp20's association with this mRNA.

EB2 counteracts the deleterious effect of SRp20 on cytoplasmic accumulation of EBV late viral mRNAs

Since SRp20 has such a drastic effect on two model mRNAs that depend on EB2 for their efficient accumulation in the cytoplasm, we tested whether depletion of SRp20 also affected the EB2-dependent cytoplasmic accumulation of specific viral mRNAs. We have previously shown that the late BDLF1 and BFRF3 mRNAs are very poorly expressed following induction of the productive cycle of a recombinant EBV lacking the EB2-coding gene (18). We thus cloned these two genes under the control of the CMV promoter into a plasmid lacking intronic sequences (plasmids pCI-FlagBDLF1-i and pCI-FlagBFRF3-i respectively) (Figure 9A). These two constructs were transfected into HeLa cells together (or not) with an expression plasmid for EB2. Cells were previously transfected with either a SRp20-specific siRNA or a control siRNA. Cytoplasmic RNAs were purified and analysed by semi-quantitative RT-PCR (Figure 9B). As expected, the level of both BFRF3 and BDLF1 mRNAs were drastically increased in the presence of EB2 (compare lanes 2 to lanes 1 of each panel). Interestingly, SRp20 depletion also drastically enhanced the level of both BFRF3 and BDLF1 (compare lanes 3 to lanes 1 of each panel) and the presence of EB2 had only a minimal (or no) additive effect in the absence of SRp20. Nuclear RNAs were also quantified in these experiments and the results always mimicked what was seen in the cytoplasm (data not shown), indicating that the low level of cytoplasmic mRNA detected in the presence of SRp20 but in the absence of EB2 was not due to an accumulation of these mRNAs in the nucleus. These data strongly suggest that the main effect of EB2 is to counteract a deleterious effect of SRp20 on intronless viral mRNAs.

In order to investigate the role of SRp20 during the replicative cycle of EBV, we used the HEK293_{EBV} cell line. HEK293_{EBV} cells carry an EBV recombinant that constitutively expresses the Green Fluorescent Protein (GFP). The replicative cycle of the virus can be activated in these cells by ectopic expression of the immediate early EBV transactivator EB1 (also called Zta or zebra).

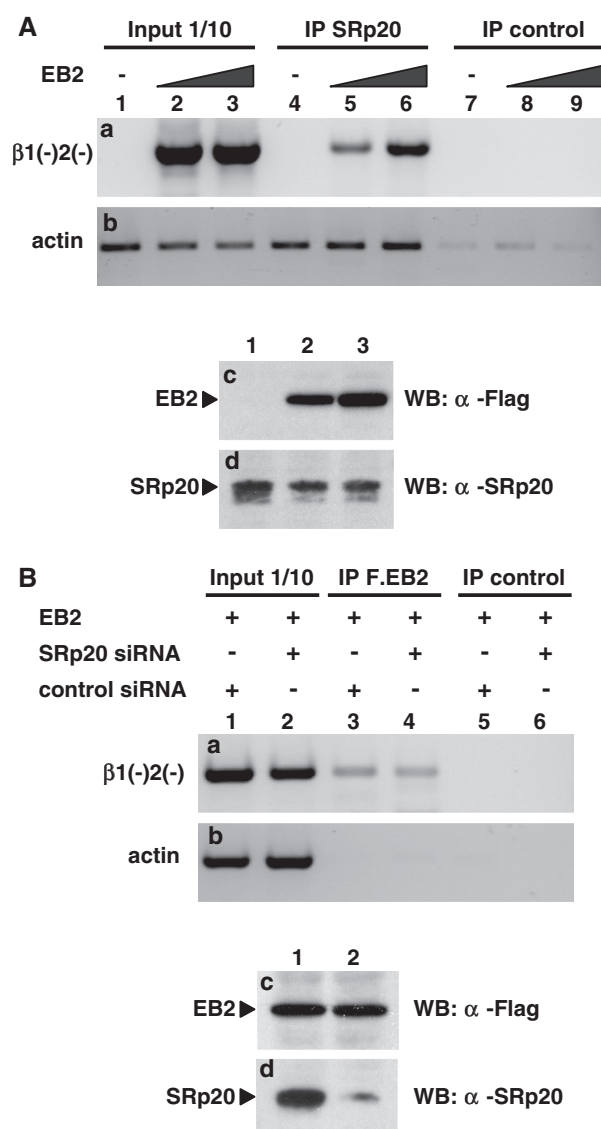


Figure 8. β -globin RNA-immunoprecipitation by anti-EB2 and anti-SRp20 antibodies. (A) HeLa cells were transfected with the $\beta 1(-)2(-)$ reporter construct together with increasing amounts (0, 0.5 or 1 μ g) of Flag-tagged EB2 expression plasmid. After UV treatment of the cells, SRp20 containing complexes were immunoprecipitated using the anti-SRp20 mAb 7B4. RNA was then purified and the amount of specific $\beta 1(-)2(-)$ transcripts (panel a) or actin control mRNAs (panel b) co-immunoprecipitated was evaluated by semi-quantitative RT-PCR. The respective amounts of EB2 (panel c) and SRp20 (panel d) present in the samples used in the RNA-immunoprecipitations were evaluated by western blot analysis. (B) HeLa cells were transfected with the $\beta 1(-)2(-)$ reporter construct together with a Flag-tagged EB2 expression plasmid after transfection of the cells with an anti-SRp20 siRNA or a control siRNA as indicated. After UV treatment of the cells, EB2-containing complexes were immunoprecipitated using an anti-Flag M2 antibody. RNA was then purified and the amount of specific $\beta 1(-)2(-)$ transcripts (panel a) or actin control mRNA (panel b) co-immunoprecipitated was evaluated by semi-quantitative RT-PCR. The respective amounts of EB2 (panel c) and SRp20 (panel d) present in the samples used in the RNA-immunoprecipitations were evaluated by western blot analysis.

The amount of virus produced is then quantified following infection of Raji cells, by counting the number of GFP-expressing cells (43). We thus transfected HEK293_{EBV} cells with a SRp20-specific siRNA or a control siRNA prior to transfection with the EB1 expression plasmid. As shown Figure 9C, virus production from cells in which SRp20 is down-regulated was reproducibly higher. This effect of SRp20 depletion on virus production was not unexpected since we have shown above, in the case of the two late viral mRNA, BDLF1 and BFRF3, that SRp20 depletion itself induced the cytoplasmic accumulation of these two mRNAs, even in the absence of EB2. In accordance with these results, over-expression of SRp20 in HEK293_{EBV} cells led to a diminution of virus production (data not shown). We then asked whether SRp20 depletion by itself could induce virus production in the absence of EB2. For this we repeated the above experiments with HEK293_{EBV-BMLF1KO} cells that carry an EBV recombinant with the EB2-coding gene deleted (16). The results shown Figure 9D indicate that in the absence of EB2, SRp20 depletion was clearly not sufficient to increase virus production. It is interesting to note that when we trans-complemented the HEK293_{EBV-BMLF1KO} cells depleted of SRp20 with an EB2 expression plasmid, we observed an increase in virus production very similar to that observed in the HEK293_{EBV} cells treated with the SRp20 siRNA.

Taken together, these results suggest that one of the mechanisms by which EB2 stimulates the cytoplasmic accumulation of viral mRNAs is by counteracting the negative effect of SRp20 on these same mRNAs.

DISCUSSION

The EBV early protein, EB2, has been found to affect multiple cellular pathways involved in mRNA processing. It was thus interesting to better understand how EB2 interacts with the cellular network of proteins involved in mRNA processing. We approached this question by setting up a wide-scale yeast two-hybrid screen. Although probably not completely exhaustive, this screen allowed us to identify 42 putative cellular partners for EB2. Among these, only Sp100 (46) and RBM15b/OTT3 (21) had been previously described as being direct interactors of the viral protein. Sp100 is a component of PML bodies, which are disrupted upon EBV productive cycle reactivation (48). RBM15b/OTT3 directly interacts with NXF1 and acts at the post-transcriptional level to activate reporter gene expression (23). hnRNPC was previously found to be present in a complex with EB2, although no direct interaction was demonstrated (49). That we have now identified this protein in our Y2H screen argues for a direct interaction between hnRNPC and EB2. Interestingly, in our list of novel interactors, we found several proteins known for their implication in splicing (PUF60, SF3A2, SRSF1, SRSF3, SRSF7 and ZRSR2) including several members of the SR family of proteins. Previously, another member of the SR family, SFRS10, was also found to interact with EB2 in a yeast 2YH screen (46). Furthermore, SRp20

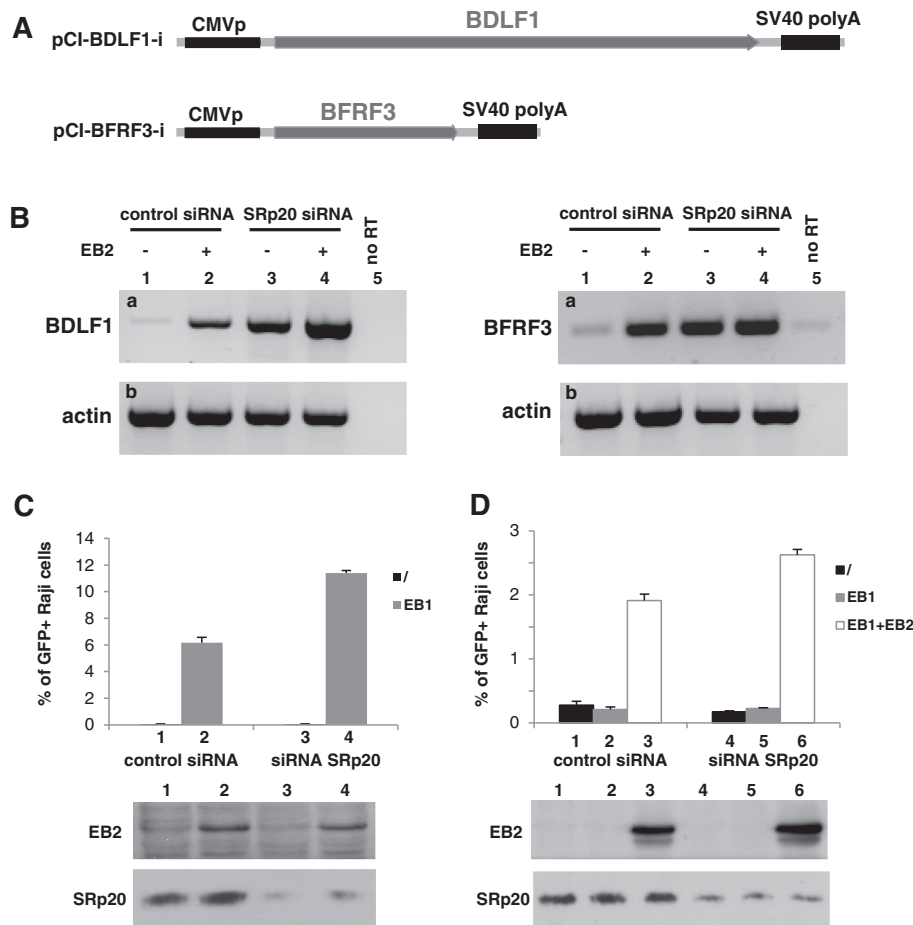


Figure 9. Impact of SRp20 depletion on the cytoplasmic accumulation of late viral mRNAs and on the production of virions. (A) Schematic representation of the pCI-BDLF1-i and pCI-BFRF3-i expression plasmids. (B) HeLa cells were co-transfected with pCI-BDLF1-i or pCI-BFRF3-i together or not with an EB2 expression plasmid. Cells were previously transfected with an anti-SRp20 siRNA or a control siRNA as indicated. Twenty-four hours later, cytoplasmic RNAs were prepared and subjected to RT-PCR using primer pairs specific for BDLF1 and BFRF3 respectively (panels a) or a primer pair specific for β -actin mRNA as internal control (panels b). (C) The EBV replicative cycle was induced in HEK293_{EBV} cells previously treated with a SRp20 siRNA or a control siRNA, by transfection of an EB1 (BZLF1) expression plasmid. Cells supernatant were recuperated 72 h later and used to infect Raji cells. The number of GFP-expressing Raji cells was then evaluated 72 h later by FACS analysis. The efficiency of EB2 expression and SRp20 depletion was evaluated by western analysis and shown in the lower panels. (D) The EBV replicative cycle was induced in HEK293_{EBV}-BMLF1^{KO} cells previously treated with a SRp20 siRNA or a control siRNA, by transfection of an EB1 (BZLF1) expression plasmid together or not with an expression plasmid for EB2. Cells supernatant were recuperated 48 h later and used to infect Raji cells. The number of GFP-expressing Raji cells was then evaluated 72 h later by FACS analysis. The efficiency of EB2 expression and SRp20 depletion was evaluated by western analysis and shown in the lower panels.

(SRSF3) was recently affinity purified in a complex with EB2 (27). The characterization of interactions between EB2 and several proteins involved in splicing was quite striking. Interestingly, these same three SR proteins were recently found to interact with IE4, the EB2 orthologue in varicella zoster (13) but the functional impact of these interactions was not studied. SRp20 also interacts with ICP27, the EBV orthologue in HSV1 (50). Both SRp20 and 9G8 co-localizes with ICP27 in HSV-infected cells and their down-regulation by use of specific siRNAs, reduces viral yields (51). However, the mechanisms by which SRp20 and 9G8 down-regulation exert this effect were not deciphered. We thus decided to study in more detail the interaction between EB2 and the three SR proteins identified in our screen.

We first confirmed the interaction between EB2 and the three SR proteins both by co-immunoprecipitation in mammalian cells and by GST-pull down. All experiments were realized in the presence of RNase showing that the interactions are RNA-independent. We also demonstrated the interaction in live cells, since over-expression of each of the three SR proteins is able to induce the nuclear re-localization of a cytoplasmic form of EB2 generated by mutating its two NLS (20). Although SF2/ASF, SRp20 and 9G8 are known to shuttle continuously between the nucleus and the cytoplasm (52) their apparent localization in cells is nuclear. EB2 is also a shuttling protein with a predominant nuclear localization: we previously showed that the cellular nuclear mRNA export protein NXF1 participates in the nuclear export

of EB2 by binding to an NES sequence present in its N-terminal (24). Moreover, we have mapped two nuclear localization sequences (NLS) rich in KR residues that are responsible for nuclear import (20). However, mutation of the two NLS sequences of EB2 was not sufficient to completely inhibit translocation of EB2 from the cytoplasm to the nucleus. Our new data suggests that the interaction of EB2 with the SR proteins could result in the active translocation of EB2 from the cytoplasm to the nucleus or in its retention in the nucleus.

One of the main functions of EB2 in the productive cycle of EBV is to stimulate the cytoplasmic accumulation of most of the early and late viral mRNAs whose particularity is to be expressed from intronless genes (16,18,53). We thus tested the importance of the interaction between EB2 and the SR proteins for the cytoplasmic accumulation of mRNA generated from intronless genes. For this, we used two different reporter models: the first is based on an intronless reporter construct coding for the Renilla luciferase. We previously found that EB2 stimulates both cytoplasmic accumulation of the mRNA transcribed from this construct and ensures its efficient translation (25). The second model is a reporter construct carrying the human β -globin cDNA (4). Interestingly, by using siRNA we found that SRp20 depletion induced an increase in the cytoplasmic accumulation of both mRNAs and that in this case of SRp20 depletion, EB2 did not increase further the amount of mRNA in the cytoplasm. Since depletion of either 9G8 or SF2/ASF had only limited effect in the same kind of experiments, we decided to focus on SRp20. Interestingly, we found that SRp20 affected in a very similar manner two EBV late mRNAs originated from the BFRF3 and BDLF1 genes respectively. In all cases, depletion of SRp20 by itself induced a strong accumulation of the mRNA in the cytoplasm and EB2 had no or little additive effect on the amount of cytoplasmic mRNA. It is also important to note that when we quantified the amount of nuclear RNA for these specific transcripts, we observed that their abundance is very low (at least 1/20th of the cytoplasmic RNA) and varies in the same proportions as that of their corresponding cytoplasmic RNA. These data suggest that SRp20 exerts a negative effect on the amount of each of the four transcripts we have analysed in this study. This effect is likely to be nuclear since SRp20 depletion affects the amount of nuclear RNA in the same way as the amount of cytoplasmic RNA. In this context, it appears that one of the main functions of EB2 is to counteract this negative effect of SRp20.

How SRp20 so drastically induces a diminution of these four different mRNA species is still under study. However, several mechanisms can be invoked, such as induction of usage of cryptic splice sites, leading to the elimination of part of the original RNA, which renders the RNA undetectable by our PCR amplification, or destabilization of the mRNA. Our preliminary data suggest that both mechanisms could be involved in this effect of SRp20 (unpublished data).

The way EB2 counteracts these negative effects of SRp20 is still speculative but the data presented in this study by using a reporter construct carrying the human

β -globin cDNA as a model, support the idea that by interacting with SRp20-specific mRNA targets, EB2 stabilizes SRp20 onto the mRNA. In effect, by using RNA-immunoprecipitations, we found that EB2 induced an increase association of SRp20 with the β -globin transcript. Interestingly, it was previously shown (4,54), that the RNA synthesized from this construct is inefficiently polyadenylated and poorly exported to the cytoplasm. Furthermore, cryptic splicing between the β -globin-coding sequence and vector sequences also contributed to lower the global amount of β -globin mRNA. The introduction in this construct of several copies of the mouse histone H2a 22-nt sequence that is specifically bound by the SR proteins, SRp20 or 9G8, was shown to promote inhibition of cryptic splicing and to enhance polyadenylation and nuclear export (4). By recruiting or stabilizing a direct interaction of SRp20 onto the β -globin mRNA, EB2 would appear to mimic the effect of the multimerized 22-nt element. SR protein-binding sites are largely degenerated and difficult to predict. Interestingly, wide-scale analyses have recently shown that SRp20 associates *in vivo* with a great number of mRNAs, including intronless mRNAs (55,56). Thus, SRp20 might interact at low affinity with several non-repertoriated sites on the β -globin mRNA. EB2 bound to the β -globin mRNA would then stabilize SRp20's association to this RNA resulting in a better polyadenylation of the transcript and inhibition of cryptic splicing. Furthermore, both SRp20 and EB2 can directly interact with NXF1 and thus lead to efficient nuclear export of their associated mRNPs (24,57).

In this study, we have described a mechanism by which EB2 recruits/stabilizes SR proteins onto mRNA generated from intronless genes. Since SR proteins are known for their role in both constitutive and alternative splicing, this suggests that EB2 might interfere with cellular mRNA splicing. Indeed, we have previously shown in different models that EB2 favours cytoplasmic accumulation of un-spliced mRNA with respect to spliced mRNAs generated from the same gene, especially when the spliced mRNAs are generated via cryptic splice sites, as is the case for the β -thalassemia gene (58). Moreover, Verma *et al.* (26) have recently shown that EB2 modulates the splicing of various cellular genes, including STAT1. In the case of STAT1, EB2 appears to change the ratio between two functionally distinct isoforms of STAT1 generated by alternative splicing (59) and SRp20 has been found to be involved in this modulation of STAT1 alternative splicing by EB2 (27). Whether this effect on cellular genes is important for EBV's replication remains to be demonstrated.

Given the drastic effect of SRp20 depletion on several EB2-target mRNAs, including two late EBV mRNAs, we were of course interested in evaluating the effect of SRp20 depletion on the EBV replicative cycle itself. However, since one of the functions of EB2 is to counteract the negative effect of SRp20 on the accumulation of specific mRNA targets, we could expect that SRp20 depletion, in the presence of EB2, might not have any effect at all, which is exactly what we observed. In fact, we even observed a slight but reproducible increase in virus

production when SRp20 was down-regulated. In accordance, over-expression of SRp20 slightly diminished virus production (unpublished observations). It is interesting to note that SRp20 depletion has a very different impact on the EBV and HSV replicative cycle respectively since in HSV-infected cells SRp20 down-regulation was found to reduce viral yields (51). These results confirm once again that although these two orthologues are both necessary for the efficient cytoplasmic accumulation of their respective viral mRNAs, their mechanisms of action are clearly different which explains that ICP27 cannot trans-complement an EB2 compromised EBV recombinant (16).

By using cells infected by a virus recombinant with the EB2-coding region deleted, we asked whether SRp20 depletion could by itself allow the production of viruses in the absence of EB2, which was not the case. Again, this result was not unexpected since EB2 has also been reported to stimulate translation of its target mRNAs (25), which could be a limited step for the progression of the viral replicative cycle. Furthermore, although we have not as yet identified any, some of the early or late viral mRNAs might be more sensitive to a similar effect of other SR proteins. Interestingly, it has been recently shown that each SR protein accumulates *in vivo* on a distinct set of mRNAs (55,56). It is thus likely that SF2/ASF or 9G8 could fulfil the same function as SRp20 for EB2-mediated cytoplasmic accumulation of mRNA species other than those used in this study, depending on their pattern of association with different RNAs.

In conclusion we report here a novel mechanism by which the EBV protein EB2 favours the efficient accumulation of viral mRNAs generated from intronless genes by antagonizing the negative effect of SRp20 on these mRNAs.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online: Supplementary Figures 1 and 2.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Drs Y. Huang and J. A. Steitz for providing plasmids $\beta 1(-)2(-)$, 1X- β G, 2X- β G and 4X- β G. The authors acknowledge the contribution of the 'Genetic Analysis and Vectorology' platform (B. Blanquier) and the 'Platim' microscope facilities of the SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (US8/UMS3444). Finally, the authors thank Dr R. Buckland for reading the manuscript.

FUNDING

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); Agence Nationale pour la Recherche [RPV06120CSA and RPV09056CSA to E.M.]; Pôle de Compétitivité Lyon-Biopôle; and Cluster de Recherche Rhône-Alpes en Infectiologie. Q.B. is recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (MRT) and of Association pour la

Recherche sur le Cancer. F.J. is the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (MRT) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM); E.M. is a CNRS scientist. Funding for open access charge: INSERM.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Iglesias, N. and Stutz, F. (2008) Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS Lett.*, **582**, 1987–1996.
- Stutz, F., Bachi, A., Doerks, T., Braun, I.C., Séraphin, B., Wilm, M., Bork, P. and Izaurralde, E. (2000) REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA*, **6**, 638–650.
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C.S., Hsu, J.L., Dias, A. and Reed, R. (2006) Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell*, **127**, 1389–1400.
- Huang, Y. and Steitz, J.A. (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol. Cell*, **7**, 899–905.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stévenin, J. and Steitz, J.A. (2003) SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol. Cell*, **11**, 837–843.
- Nojima, T., Hirose, T., Kimura, H. and Hagiwara, M. (2007) The interaction between cap-binding complex and RNA export factor is required for intronless mRNA export. *J. Biol. Chem.*, **282**, 15645–15651.
- Chen, I.H., Li, L., Silva, L. and Sandri-Goldin, R.M. (2005) ICP27 recruits Aly/REF but not TAP/NXF1 to herpes simplex virus type 1 transcription sites although TAP/NXF1 is required for ICP27 export. *J. Virol.*, **79**, 3949–3961.
- Koffa, M., Clements, J., Izaurralde, E., Wadd, S., Wilson, S., Mattaj, J. and Kuersten, S. (2001) Herpes simplex virus ICP27 protein provides viral mRNAs with access to the cellular mRNA export pathway. *EMBO J.*, **20**, 5769–5778.
- Lischka, P., Toth, Z., Thomas, M., Mueller, R. and Stamminger, T. (2006) The UL69 transactivator protein of human cytomegalovirus interacts with DEXD/H-Box RNA helicase UAP56 to promote cytoplasmic accumulation of unspliced RNA. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 1631–1643.
- Malik, P., Blackburn, D.J. and Clements, B. (2004) The evolutionarily conserved Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF57 protein interacts with REF protein and acts as an RNA export factor. *J. Biol. Chem.*, **279**, 33001–33011.
- Boyne, J.R., Colgan, K.J. and Whitehouse, A. (2008) Recruitment of the complete hTREX complex is required for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus intronless mRNA nuclear export and virus replication. *PLoS Pathog.*, **4**, e1000194.
- Williams, B.J., Boyne, J.R., Goodwin, D.J., Roaden, L., Hautbergue, G.M., Wilson, S.A. and Whitehouse, A. (2005) The prototype gamma-2 herpesvirus nucleocytoplasmic shuttling protein, ORF 57, transports viral RNA through the cellular mRNA export pathway. *Biochem. J.*, **387**, 295–308.
- Ote, I., Lebrun, M., Vandevenne, P., Bontems, S., Medina-Palazon, C., Manet, E., Piette, J. and Sadzot-Delvaux, C. (2009) Varicella-zoster virus IE4 protein interacts with SR proteins and exports mRNAs through the TAP/NXF1 pathway. *PLoS One*, **4**, e7882.
- Farjot, G., Buisson, M., Duc Dodon, M., Gazzolo, L., Sergeant, A. and Mikaelian, I. (2000) Epstein-Barr virus EB2 protein exports unspliced RNA via a Crm-1-Independent pathway. *J. Virol.*, **74**, 6068–6076.
- Semmes, O.J., Chen, L., Sarisky, R.T., Gao, Z., Zhong, L. and Hayward, S.D. (1998) Mta has properties of an RNA export protein and increases cytoplasmic accumulation of Epstein-Barr virus replication gene mRNA. *J. Virol.*, **72**, 9526–9534.
- Gruffat, H., Batisse, J., Pich, D., Neuhiel, B., Manet, E., Hammerschmidt, W. and Sergeant, A. (2002) Epstein-Barr virus

- mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J. Virol.*, **76**, 9635–9644.
17. Hiriart, E., Bardouillet, L., Manet, E., Gruffat, H., Penin, F., Montserret, R., Farjot, G. and Sergeant, A. (2003) A region of the Epstein-Barr virus (EBV) mRNA export factor EB2 containing an arginine-rich motif mediates direct binding to RNA. *J. Biol. Chem.*, **278**, 37790–37798.
 18. Batisse, J., Manet, E., Middeldorp, J., Sergeant, A. and Gruffat, H. (2005) Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for intranuclear capsid assembly and production of gp350. *J. Virol.*, **79**, 14102–14111.
 19. Han, Z., Marendy, E., Wang, Y.D., Yuan, J., Sample, J.T. and Swaminathan, S. (2007) Multiple roles of Epstein-Barr virus SM protein in lytic replication. *J. Virol.*, **81**, 4058–4069.
 20. Hiriart, E., Farjot, G., Gruffat, H., Nguyen, M.V., Sergeant, A. and Manet, E. (2003) A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 335–342.
 21. Hiriart, E., Gruffat, H., Buisson, M., Mikaelian, I., Keppler, S., Meresse, P., Mercher, T., Bernard, O.A., Sergeant, A. and Manet, E. (2005) Interaction of the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 with human Spen proteins SHARP, OTT1, and a novel member of the family, OTT3, links Spen proteins with splicing regulation and mRNA export. *J. Biol. Chem.*, **280**, 36935–36945.
 22. Lindtner, S., Zolotukhin, A.S., Uranishi, H., Bear, J., Kulkarni, V., Smulevitch, S., Samiotaki, M., Panayotou, G., Felber, B.K. and Pavlakis, G.N. (2006) RNA-binding motif protein 15 binds to the RNA transport element RTE and provides a direct link to the NXF1 export pathway. *J. Biol. Chem.*, **281**, 36915–36928.
 23. Uranishi, H., Zolotukhin, A.S., Lindtner, S., Warming, S., Zhang, G.M., Bear, J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Pavlakis, G.N. and Felber, B.K. (2009) The RNA-binding motif protein 15B (RBM15B/OTT3) acts as cofactor of the nuclear export receptor NXF1. *J. Biol. Chem.*, **284**, 26106–26116.
 24. Juillard, F., Hiriart, E., Sergeant, N., Vingtdoux-Didier, V., Drobecq, H., Sergeant, A., Manet, E. and Gruffat, H. (2009) Epstein-Barr virus protein EB2 contains an N-terminal transferable nuclear export signal that promotes nucleocytoplasmic export by directly binding TAP/NXF1. *J. Virol.*, **83**, 12759–12768.
 25. Ricci, E.P., Mure, F., Gruffat, H., Decimo, D., Medina-Palazon, C., Ohlmann, T. and Manet, E. (2009) Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 4932–4943.
 26. Verma, D. and Swaminathan, S. (2008) Epstein-Barr virus SM protein functions as an alternative splicing factor. *J. Virol.*, **82**, 7180–7188.
 27. Verma, D., Bais, S., Gaillard, M. and Swaminathan, S. (2010) Epstein-Barr virus SM protein utilizes cellular splicing factor SRp20 to mediate alternative splicing. *J. Virol.*, **84**, 11781–11789.
 28. Shepard, P.J. and Hertel, K.J. (2009) The SR protein family. *Genome Biol.*, **10**, 242.
 29. Long, J.C. and Caceres, J.F. (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.*, **417**, 15–27.
 30. Sanford, J.R., Gray, N.K., Beckmann, K. and Caceres, J.F. (2004) A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev.*, **18**, 755–768.
 31. Michlewski, G., Sanford, J.R. and Caceres, J.F. (2008) The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol. Cell.*, **30**, 179–189.
 32. Bedard, K.M., Daijogo, S. and Semler, B.L. (2007) A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *EMBO J.*, **26**, 459–467.
 33. Swartz, J.E., Bor, Y.C., Misawa, Y., Rekosh, D. and Hammarskjöld, M.-L. (2007) The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element. *J. Biol. Chem.*, **282**, 19844–19853.
 34. Delecluse, H.J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. and Hammerschmidt, W. (1999) A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 5188–5193.
 35. Walhout, A.J., Temple, G.F., Brasch, M.A., Hartley, J.L., Lorton, M.A., van den Heuvel, S. and Vidal, M. (2000) Tracing lifestyle adaptation in prokaryotic genomes. *Front Microbiol.*, **3**, 48.
 36. Pellet, J., Tafforeau, L., Lucas-Hourani, M., Navratil, V., Meyniel, L., Achaz, G., Guironnet-Paquet, A., Aublin-Gex, A., Caignard, G., Cassonnet, P. et al. (2010) ViralORFeome: an integrated database to generate a versatile collection of viral ORFs. *Nucleic Acids Res.*, **38**, D371–D378.
 37. Medina-Palazon, C., Gruffat, H., Mure, F., Filhol, O., Vingtdoux-Didier, V., Drobecq, H., Cochet, C., Sergeant, N., Sergeant, A. and Manet, E. (2007) Protein Kinase CK2 phosphorylation of EB2 regulates its function in the production of Epstein-Barr virus infectious viral particles. *J. Virol.*, **81**, 11850–11860.
 38. Albers, M., Kranz, H., Kober, I., Kaiser, C., Klink, M., Suckow, J., Kern, R. and Koegl, M. (2005) Automated yeast two-hybrid screening for nuclear receptor-interacting proteins. *Mol. Cell Proteomics*, **4**, 205–213.
 39. Tafforeau, L., Rabourdin-Combe, C. and Lotteau, V. (2012) Virus-Human Cell Interactomes. In: Suter, B. and Wanker, E.E. (eds), *Two Hybrid Technologies*. Springer Protocols, Humana Press, Springer.
 40. Vidalain, P.O., Boxem, M., Ge, H., Li, S. and Vidal, M. (2004) Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods*, **32**, 363–370.
 41. Pellet, J., Meyniel, L., Vidalain, P.O., de Chasse, B., Tafforeau, L., Lotteau, V., Rabourdin-Combe, C. and Navratil, V. (2009) pISTil: a pipeline for yeast two-hybrid interaction sequence tags identification and analysis. *BMC Res. Notes*, **2**, 220.
 42. Walhout, A.J. and Vidal, M. (2001) High-throughput yeast two-hybrid assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods*, **24**, 297–306.
 43. Delecluse, H.J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. and Hammerschmidt, W. (1998) Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 8245–8250.
 44. Blaustein, M., Pelisch, F., Tanos, T., Muñoz, M.J., Wengier, D., Quadraña, L., Sanford, J.R., Muschietti, J.P., Kornblihtt, A.R., Cáceres, J.F. et al. (2005) Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1037–1044.
 45. Boyne, J.R. and Whitehouse, A. (2006) Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 15190–15195.
 46. Calderwood, M.A., Venkatesan, K., Xing, L., Chase, M.R., Vazquez, A., Holthaus, A.M., Ewence, A.E., Li, N., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, D.E. et al. (2007) Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 7606–7611.
 47. Huang, Y. and Carmichael, G.G. (1997) The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1-related mRNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 10104–10109.
 48. Bell, P., Lieberman, P.M. and Maul, G.G. (2000) Lytic but not latent replication of Epstein-Barr virus is associated with PML and induces sequential release of nuclear domain 10 proteins. *J. Virol.*, **74**, 11800–11810.
 49. Key, S.C., Yoshizaki, T. and Pagano, J.S. (1998) The Epstein-Barr virus (EBV) SM protein enhances pre-mRNA processing of the EBV DNA polymerase transcript. *J. Virol.*, **72**, 8485–8492.
 50. Siabica, K.S., Dai, Q.J. and Sandri-Goldin, R.M. (2003) ICP27 interacts with SRPK1 to mediate HSV splicing inhibition by altering SR protein phosphorylation. *EMBO J.*, **22**, 1608–1619.
 51. Escudero-Paunetto, L., Li, L., Hernandez, F.P. and Sandri-Goldin, R.M. (2010) SR proteins SRp20 and 9G8 contribute to efficient export of herpes simplex virus 1 mRNAs. *Virology*, **401**, 155–164.
 52. Cáceres, J.F., Screaton, G.R. and Krainer, A.R. (1998) A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.*, **12**, 55–66.
 53. Verma, D., Ling, C., Johannsen, E., Nagaraja, T. and Swaminathan, S. (2009) Negative autoregulation of EBV

- replicative gene expression by Epstein-Barr virus (EBV) SM protein. *J. Virol.*, **83**, 8041–8050.
54. Huang, Y., Wimler, K.M. and Carmichael, G.G. (1999) Intronless mRNA transport elements may affect multiple steps of pre-mRNA processing. *EMBO J.*, **18**, 1642–1652.
55. Sapra, A.K., Ankö, M.L., Grishina, I., Lorenz, M., Pabis, M., Poser, I., Rollins, J., Weiland, E.M. and Neugebauer, K.M. (2009) SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo. *Mol. Cell*, **34**, 179–190.
56. Ankö, M.L., Morales, L., Henry, I., Beyer, A. and Neugebauer, K.M. (2010) Global analysis reveals SRp20- and SRp75-specific mRNPs in cycling and neural cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 962–970.
57. Hargous, Y., Hautbergue, G.M., Tintaru, A.M., Skrisovska, L., Golovanov, A.P., Stevenin, J., Lian, L.Y., Wilson, S.A. and Allain, F.H. (2006) Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8. *EMBO J.*, **25**, 5126–5137.
58. Buisson, M., Hans, F., Kusters, I., Duran, N. and Sergeant, A. (1999) The C-terminal region but not the Arg-X-Pro repeat of Epstein-Barr virus protein EB2 is required for its effect on RNA splicing and transport. *J. Virol.*, **73**, 4090–4100.
59. Ruvolo, V., Navarro, L., Sample, C.E., David, M., Sung, S. and Swaminathan, S. (2003) The Epstein-Barr virus SM protein induces STAT1 and interferon-stimulated gene expression. *J. Virol.*, **77**, 3690–3701.